

**Charakterisierung humaner regulatorischer
CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ T-Lymphozyten und
Analyse der Suppressorfunktion des
Peptid-MHC Klasse I Komplexes**

Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät III -
Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg**

eingereicht von

**Dipl. Biol. Karin Fischer
aus Regensburg**

Regensburg, im Juli 2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 03. Juli 2003

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. A. Mackensen

Prüfungsausschuss: Vorsitz: Prof. Dr. S. Schneuwly

1. Prüfer: Prof. Dr. S. Modrow

2. Prüfer: Prof. Dr. A. Mackensen

3. Prüfer: Prof. Dr. A. Kurtz

"Eine Theorie sollte so einfach wie möglich sein, aber nicht einfacher. "

Albert Einstein

Inhalt

1	Abkürzungsliste	8
2	Einleitung	10
2.1	Periphere Toleranzinduktion	10
2.1.1	Toleranzinduktion durch T-Zell-Subpopulationen	11
2.1.2	Modell der Antigen-spezifischen Toleranzinduktion	12
2.1.3	Humane DN T-Zell Subpopulationen	13
2.1.3.1	TCR $\alpha\beta^+$ DN T-Zellen	13
2.1.3.2	TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zellen	15
2.2	pMHC-I Komplexe als Effektormoleküle	17
2.2.1	Die Funktion des MHC-I für Aktivierung und Toleranzinduktion	17
2.2.2	Modifizierung der MHC-Beladung <i>in vitro</i>	19
2.2.3	Die spezifische Antigen-Erkennung durch den TCR	20
2.2.4	Aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) von T-Zellen	23
2.2.5	Funktion der kostimulatorischen Moleküle	26
2.3	Fragestellung	29
3	Material und Methoden	31
3.1	Material	31
3.1.1	Medien, Puffer und Seren	31
3.1.2	Antikörper	33
3.1.3	Blockadeagentien	35
3.1.4	Farbstoffe und Färbeagentien	36
3.1.5	HLA-A2-bindende Peptide	36
3.1.6	Peptid-MHC-Tetramere	36
3.1.7	Zytokine	36
3.1.8	Beads	37
3.1.9	Zellkulturflaschen, -platten, -röhrchen	37
3.1.10	Blutproben	38
3.1.10.1	Gesunde Spender	38
3.1.10.2	Patienten mit Autoimmunerkrankungen	38
3.2	Methoden	39
3.2.1	Kultur von primären Melanomzellen und T2 Zellen	39
3.2.2	Beladung der T2 Zellen	39
3.2.3	Isolierung von MNC über Dichtegradientenzentrifugation	39
3.2.4	Adhärenzselektion von Monozyten	40
3.2.5	Gegenstromelutriation	40
3.2.6	Generierung von dendritischen Zellen	40

3.2.7	Exogene Beladung von dendritischen Zellen (DC)	41
3.2.8	pMHC Transferversuche	41
3.2.9	Konditionierungskultur von DN T-Zellen	41
3.2.10	Generierung von CD8 ⁺ spezifischen T-Zell-Linien	42
3.2.11	Kryokonservierung von Zellen	42
3.2.12	Auftauen von Zellen	42
3.2.13	Antikörperfärbungen	42
3.2.13.1	Direkte Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen	42
3.2.13.2	Indirekte Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen	43
3.2.13.3	Enzymatisch verstärkte Antikörperfärbung	43
3.2.13.4	Intrazellulärfärbung	43
3.2.14	pMHC-Tetramerfärbung	44
3.2.15	Generierung von PHA-Blasten	44
3.2.16	Magnetische Zellseparation	44
3.2.16.1	Anreicherung von Zellen nach der Miltenyi-Methode	45
3.2.16.2	Voraufreinigung der Zellen nach der Dynal-Methode	46
3.2.17	Durchflusszytometrie	47
3.2.18	Fluoreszente Zellsortierung	47
3.2.19	Klonierung von DN T-Zellen	48
3.2.20	Cytokine-Bead-Array (CBA)	48
3.2.21	Mixed lymphocyte reaction (MLR)	48
3.2.22	⁵¹ Cr-Freisetzungstest	49
3.2.23	PKH26 Apoptose-Test	49
3.2.24	Autologer Apoptose-Test	50
4	Resultate	51
4.1	Das immunsuppressive Potential humaner DN T-Zellen	51
4.1.1	DN T-Zellen bei gesunden Spendern	51
4.1.2	Gewinnung von DN T-Zellen	52
4.1.2.1	<i>Ex vivo</i> Aufreinigung von DN T-Zellen	52
4.1.2.2	DN T-Zell-Klone	54
4.1.3	Zytokinsekretionsmuster von DN T-Zellen	55
4.1.4	Transfer von pMHC-Komplexen	56
4.1.4.1	Aufnahme von pMHC-Komplexen durch DN T-Zellen	56
4.1.4.2	Abgabe von pMHC-Komplexen durch verschiedene Immunzellen	58
4.1.4.3	pMHC-Transfer durch T2 Zellen	61
4.1.4.4	Funktionalität transferierter pMHC-Moleküle	63
4.1.5	Apoptose-Induktion durch DN T-Zellen im allogenen System	65
4.1.5.1	Proliferationsinhibition einer MLR	65

4.1.5.2	Verlust der Lysekapazität von alloreaktiven Zellen durch DN T-Zellen	66
4.1.6	Apoptose-Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellen im autologen System	69
4.1.6.1	Testsystem.....	69
4.1.6.2	Antigen-spezifische Deletion von CD8 ⁺ CTL.....	71
4.1.6.3	Zytokinproduktion während der Antigen-spezifischen Suppression.....	76
4.1.6.4	Kinetik der Antigen-spezifischen Suppression und AnnexinV-Bindung.....	77
4.1.6.5	Mechanismus der Antigen-spezifischen Suppression.....	78
4.1.6.5.1	Der Perforin/ Granzyme Signalweg.....	78
4.1.6.5.2	Der Fas/FasL Signalweg	80
4.1.7	Die Rolle von DN T-Zellen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen.....	82
4.2	pMHC-Moleküle als Effektorstrukturen	87
4.2.1	Suppression durch MHC-I-Moleküle im T2 Modellsystem.....	87
4.2.1.1	Die T2 Zelllinie	87
4.2.1.2	Der PKH26- Test.....	88
4.2.1.3	Retrograde Apoptose-Induktion durch T2 Zellen	89
4.2.1.4	Mechanismen der retrograden Apoptose-Induktion durch T2 Zellen.....	93
4.2.2	Apoptose-Induktion durch Melan-A-exprimierende Tumorzellen	95
4.2.3	Apoptose von Antigen-spezifischen CTL durch lösliche pMHC- Komplexe	97
5	Diskussion.....	98
5.1	Antigen-spezifische Immunregulation durch CD4- CD8- doppeltnegative T-Zellen.....	98
5.1.1	Der pMHC-Transfer als Basis für die Suppressorfunktion	98
5.1.2	Interaktion von DC und DN T-Zellen	103
5.1.3	Suppression von alloreaktiven T-Zellen durch DN T-Zellen.....	104
5.1.4	Apoptose-Induktion von Antigen-spezifischen CTL durch autologe DN T-Zellen	106
5.1.5	Mechanismen der DN T-Zell-vermittelten Suppression	109
5.1.6	DN T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen	110
5.1.7	Vergleich von TCR $\alpha\beta$ + und TCR $\gamma\delta$ + DN T-Zellen.....	113
5.2	Modellsystem für Antigen-spezifische T-Zell-Suppression auf der Basis der T2 Zelllinie	116

5.2.1	Apoptose-Induktion und retrograde Apoptose-Induktion durch T2 Zellen.....	116
5.2.2	Immunbiologische und klinische Aspekte der pMHC- vermittelten Apoptose von Antigen-spezifischen T-Zellen	120
5.2.3	Die protektive Rolle der kostimulatorischen Moleküle - ein neues, hypothetisches Modell der Antigen-spezifischen Suppression	123
5.3	Zusammenfassung und Ausblick	126
6	Anhang	128
6.1	Berechnungsmethoden	128
6.1.1	Berechnung vitaler Zellen in den autologen Apoptose-Tests	128
6.1.2	Auswertung PKH26-Test	129
6.2	Danksagung.....	130
6.3	Erklärung	132
6.4	Literaturverzeichnis.....	133

1 Abkürzungsliste

Ag	Antigen
AICD	Activation induced cell death ("Aktivierungs-induzierter Zelltod")
AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
Ann	AnnexinV; bindet an Phosphatidylserine
anti-pan TCR δ mAK	Antikörper zur Depletion aller TCR δ -Ketten exprimierenden T-Zellen
APC	Allophycocyanin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
APC	Antigen presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
Bim	Protein der bcl-2 Familie; assoziiert mit bcl-2 und induziert Apoptose
CBA	Cytokine bead array (durchflusszytometrisches Verfahren der Zytokinmessung)
CD1d	MHC-Klasse I ähnliches Antigen-Präsentations-Molekül
CMA	ConcanamycinA (Folimycin)
CMV	Cytomegalie-Virus
CTL	Cytotoxic T lymphocyte (zytotoxische T-Zelle)
CTLA-4	CD154; Ligand für CD28
DC	dendritische Zellen
DN	doppelnegativ (bzgl. der Antigene CD4 ⁺ und CD8 ⁺)
ER	endoplasmatisches Reticulum
FACS	Fluorescence activated cell scanning; Durchflusszytometrische Messmethode
FasL	Fas-Ligand (Ligand des Fas-Rezeptors)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
FLT-3	fms-like tyrosine kinase-3; Mitglied der Rezeptor-Tyrosinkinasen
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter) im Durchflusszytometer
GFP	Green fluorescent protein
gp100	Melanozyten-spezifisches, Tumor-assoziiertes Antigen
GVHD	Graft versus host disease; Abstoßungsreaktion nach KMT
H-2D(d)/P18-I10	P18-I10 (HIV-Peptid) gebunden an H-2D(d) MHC
HC	Heavy chain - schwere Kette des MHC-Moleküls
HEL	Erythroleukämische Zelllinie
HLA	Human leucocyte antigen; Synonym für MHC
IFN- γ	Interferon- γ ; Zytokin
IgG	Immunglobulin G; häufigster Isotyp im Blut; Verwendung für Kontrollfärbungen zur Ermittlung der unspez. Bindung von mAK
IL-10	Interleukin-10; immunsupprimierendes Zytokin
KMT	Knochenmarktransplantation

LFA-1	funktionelles Leukozyten-Antigen (Adhäsionsmolekül von T-Zellen)
mAK	monoklonaler Antikörper
Melan-A	MART-1; Selbstantigen auf Melanocyten; Überexprimiert auf Melanomzellen
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitsgruppierung im Genom
MHC-I	MHC-Klasse-I-Komplex; Bindungspartner von CD8 ⁺ Killerzellen
MLR	Mixed-lymphocyte-reaction; gemischte Lymphozytenreaktion
MNC	mononukleäre Zellen; Zellfraktion aus Monozyten u. Lymphozyten
Mono	Monozyten
MS	Multiple Sklerose
NK-T-Zelle	Zelle mit Eigenschaften von natürlichen Killerzellen und T-Zellen
PBC	primär biliäre Zirrhose, chronische Entzündung im Bereich der kleinen Gallengänge
PBL	periphere Blut-Lymphozyten; Bestandteil der mononukleären Zellen
PC-5	Phycoerythrin-Cyanin-5 (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PE	Phycoerythrin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin; starkes T-Zell-Stimulans
PI	Propidium-Iodid
pMHC	Genprodukt des Major-Histokompatibilitäts-Komplexes mit gebundenem Peptid
rDC	reife dendritische Zellen
SCID	Severe combined immune deficiency
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter) im Durchflusszytometer
β-2M	β-2 Microglobulin
TAP	Transporter associated with antigen-processing; wichtiges Peptidtransport-Protein für die MHC-Präsentation
TCGF	T-cell growth factor (Zytokin-cocktail aus einem Zellüberstand)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TCRαβ	T-Zell-Rezeptor bestehend aus α und β Kette (häufiger TCR-Typ)
TCRγδ	T-Zell-Rezeptor bestehend aus γ und δ Kette (seltener TCR-Typ)
TCRVα24	Familie von TCRV
TGF-β	Transforming-growth-factor-β (Zytokin)
TNF-α	Tumor-Nekrose Faktor-α
TM	MHC-Tetramer
TNF-R	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
uDC	unreife dendritische Zelle
Z-DEVD-FMK	synthetisches Peptid mit der Sequenz Z-Asp-Glu-Val-Asp-FMK (FMK, Fluoromethyl-Keton); Caspase-3 Inhibitor

2 Einleitung

2.1 Periphere Toleranzinduktion

Hauptaufgabe des Immunsystems ist zum einen der Schutz des Organismus vor externen Angriffen, z.B. durch Bakterien, Viren und Parasiten, und zum anderen die Eliminierung von entarteten und seneszenten Zellen, welche aufgrund interner Alterungs- und Mutationsprozesse entstehen.

Darüber hinaus muss die Ausbildung und der Bestand immunologischer Selbsttoleranz durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk gewährleistet sein. Das allgemein akzeptierte Konzept selektiver Fremd- und Eigenerkennung durch das Immunsystem beruht vorwiegend auf der zentralen Deletion potentiell autoimmunreaktiver T-Zell-Klone im Thymus in den frühen Lebensjahren eines Menschen. Es ist jedoch auch bekannt, dass dieser Prozess, in welchem der eigen-reaktive Teil des Immunsystems eliminiert wird, nicht ausreichend ist, um jegliche Sensitivität des Immunsystems gegenüber Selbstantigenen zu unterbinden [1]. Verschiedene Forschergruppen haben inzwischen die Präsenz von autoimmunreaktiven T-Zell-Klonen im peripheren Blut von gesunden Individuen nachgewiesen [2-6]. Das Vorhandensein von potentiell autoimmunreaktiven T-Zell-Klonen scheint somit *per se* nicht pathologisch zu sein.

Neuere *in vitro* Daten, aber auch klinische Daten, sprechen vielmehr dafür, dass in gesunden Individuen periphere autoimmunreaktive T-Zell-Klone unter der permanenten Überwachung durch periphere Toleranzinduktionsmechanismen stehen [7;8]. Der überzeugendste klinische Hinweis hierfür ist die sog. "autologe GVHD", eine Art Abstoßungsreaktion gegen Eigengewebe bei der Gabe von Immunsuppressiva. Dieses Phänomen, mit dem sich Hess et al. am ausführlichsten befasst haben, stellt eine milde Form einer Abstoßungsreaktion dar, wie sie z.B. von der allogenen Knochenmarkstransplantation (KMT) bekannt ist [9-11]. Die Frage, wie es zu Abstoßungsphänomenen durch die Transplantation von Eigengewebe, welches dem Immunsystem bekannt ist, kommen kann, führt zur zentralen Frage nach peripherer Toleranz. Bisherige Erklärungen postulieren eine Gleichgewichtsverschiebung zwischen einem toleranzinduzierenden und einem aktivierenden System. Unter bestimmten Umständen scheint die Immunsuppression zu einer Frequenzerhöhung von autoimmunreaktiven CD8⁺ T-Zellen zu führen, die sich jedoch nicht unbedingt klinisch manifestieren muss. Auch bei Mammakarzinompatientinnen konnten Hess et al. *in vitro* eine Erhöhung der Autoreaktivität nach autologer peripherer Blutstammzelltransplantation detektieren [12]. Die notwendige Existenz eines peripheren toleranzinduzierenden immunologischen Überwachungssystems wird heutzutage kaum mehr bestritten.

2.1.1 Toleranzinduktion durch T-Zell-Subpopulationen

Das Konzept einer lymphozytenvermittelten Immunsuppression wurde bereits ca. 1970 entwickelt, der Beobachtung folgend, dass immunologische Toleranz in naiven Tieren durch den Transfer von antigenstimulierten T-Lymphozyten induziert werden kann [13;14]. Die Identifikation von regulatorischen $CD4^+$ T-Zell-Subpopulationen in den letzten Jahren weist auf die Richtigkeit dieses Konzeptes hin.

Die 1997 von der Arbeitsgruppe um Roncarolo beschriebenen regulatorischen $CD4^+$ T-Zellen (Tr1) sind in der Lage, große Mengen von IL-10 zu produzieren, jedoch wenig IL-2 und kein IL-4 [15;16]. Sofern diese Zellen während ihrer „Induktionsphase“ mit IL-10 in Kontakt kommen, reifen sie selber zu IL-10 produzierenden Suppressorzellen heran. Die von Roncarolo et al. gewonnenen Tr1- T-Zell-Klone können die Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen nach Antigenstimulation inhibieren und in SCID Mäusen die Entwicklung einer Colitis, welche durch $CD4^+$ $CD45^{RB^{++}}$ T-Zellen induziert wird, verhindern.

Eine weitere Subpopulation regulatorischer T-Zellen, die derzeit im Zentrum wissenschaftlichen Interesses steht, sind $CD4^+$ T-Zellen, die $CD25^+$ koexprimieren. Diese $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen, die nach Antigen-spezifischer und -unspezifischer Stimulation selber kaum proliferieren, zeigen die Eigenschaft, koaktivierte, konventionelle $CD4^+CD25^-$ T-Zellen in ihrer Proliferation stark zu hemmen [17;18]. Humane $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen wurden parallel von mehreren Gruppen identifiziert und mit vergleichbaren supprimierenden Eigenschaften wie im Maussystem beschrieben [19-21]. Während es als bewiesen gilt, dass zur Entfaltung der inhibierenden Funktion von regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen ein Zell-Zell-Kontakt nötig ist, ist der exakte Mechanismus der Suppression noch weitgehend ungeklärt. *In vitro* scheinen weder gegen IL-10 noch gegen TGF- β gerichtete neutralisierende Antikörper eine Blockierung der Suppression zu erreichen, während *in vivo* verabreichte blockierende Antikörper gegen IL-10 bzw. TGF- β einen Rückgang der Suppression bewirken [19;22;23]. Ferner gibt es kontroverse Daten bezüglich der Rolle von CTLA-4 bei der regulatorischen Funktion von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen [24].

In der Literatur sind auch $CD8^+$ T-Zellen als Suppressorzellen beschrieben [25]: $CD8^+$ T-Zellen, die über CD40-Ligand-stimulierte plasmazytoide dendritische Zellen (DC2) aktiviert werden, differenzieren zu $CD8^+$ Zellen mit schwachen proliferativen und zytotoxischen Eigenschaften. Im Vergleich zu $CD8^+$ T-Zellen, die nach Stimulation mit monozytengereiften, interdigitierenden DCs „aktivatorische“ Zytokine produzieren, sezernieren Suppressor- $CD8^+$ Zellen vorwiegend IL-10. IL-10 ist eines der Schlüsselzytokine regulatorischer T-Zellen und kann das Immunsystem auf verschiedenen Wegen inhibieren, z.B. durch die Proliferationshemmung von T-Zellen [16].

Ein Kennzeichen bisher beschriebener lymphozytärer Suppressorpopulationen ist deren fehlende Antigenspezifität bei der Ausübung ihrer Suppressorfunktion [17]. Sezernierte

Botenstoffe wie IL-10 können vielfältige Wirkungen auf verschiedene Zellen innerhalb des Mikromilieus um eine zytokinproduzierende Zelle haben.

Die Suche nach Antigen-spezifischen Regulatorzellen ist von großem Interesse für das Verständnis und die Entwicklung neuer Therapieansätze für Autoimmunerkrankungen, deren Entstehen oftmals mit Immunreaktionen gegen distinkte Autoantigene in Zusammenhang gebracht wird [26;27]. Ferner ist davon auszugehen, dass Antigen-spezifische, regulatorische T-Zellen an der Induktion peripherer Toleranz beteiligt sind, was besondere Implikationen für Fremdorgantransplantation und periphere Stammzelltransplantation hat.

2.1.2 Modell der Antigen-spezifischen Toleranzinduktion

Im Jahr 2000 wurde von Zhang et al. erstmalig ein Modell der antigen-spezifischen Suppression vorgestellt [28]. Diese Autoren wiesen die Existenz muriner CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ TCRαβ⁺ T-Zellen nach, welche in der Lage sind, Peptid-MHC (pMHC)-Komplexe von antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufzunehmen, auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und über diese Moleküle spezifisch mit aktivierten T-Zellen zu interagieren (siehe Abb. 1). Das Phänomen des pMHC Transfers auf T-Zellen wurde bereits vor etlichen Jahren beschrieben. Es ist bekannt, dass es im Zuge der Antigenerkennung an der sog. „immunologischen Synapse“ zwischen TCR und MHC zu weitreichenden Umorganisationsprozessen [29] kommt. Dazu zählen z.B. das Rearrangement von Cytoskelett bzw. Rezeptorbesatz [30-32] und die TCR-Internalisierung [33;34] der T-Zelle. Darüber hinaus scheint auch der erkannte MHC von dem Rearrangement betroffen zu sein, indem ein Transfer von MHC-Molekülen auf die T-Zelle erfolgen kann. Im Jahr 2000 konnten Huang et al. anhand von konfokalmikroskopischen Untersuchungen, Intrazellulärfärbungen sowie Immunpräzipitation zeigen, dass T-Zellen im Zuge der Antigenerkennung durch den TCR in der Lage sind, pMHC-Komplexe von den APC zu akquirieren. Nach einer minutenschnellen Clusterbildung an der Kontaktstelle kommt es zu einer endozytotischen Aufnahme dieser MHC-Cluster in die T-Zellen [35]. Kurz danach konnte GFP-gekoppeltes pMHC in sauren Kompartimenten wie Endosomen und Lysosomen nachgewiesen werden. Durch die Aufnahme von pMHC-Komplexen werden die T-Zellen sensitiv gegenüber Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Diese Befunde sprechen dafür, dass ein nennenswerter Anteil von pMHC auf die Zelloberfläche der T-Zellen gelangt. Murine DN T-Zellen können, wie bereits vorher erwähnt, die transferierten pMHC-I Komplexe auf ihrer Zelloberfläche als Effektorstruktur einsetzen und Apoptose in aktivierten Antigen-spezifischen T-Zellen induzieren (siehe Abb. 1). Bisher ist unklar, ob bei der Akquirierung von pMHC-Komplexen auch Antigen-unabhängige Transferprozesse eine Rolle spielen können. In der Literatur kennt man Antigen-abhängige Transfer-Prozesse von pMHC-Molekülen auf T-Zellen [35-37]. Jedoch ist auch die Kontaktaufnahme [38;39] bzw. die Formierung unspezifischer Synapsen [40] zwischen

T-Zellen und DC beschrieben, in welchen die Antigenerkennung durch den TCR keine Rolle spielt.

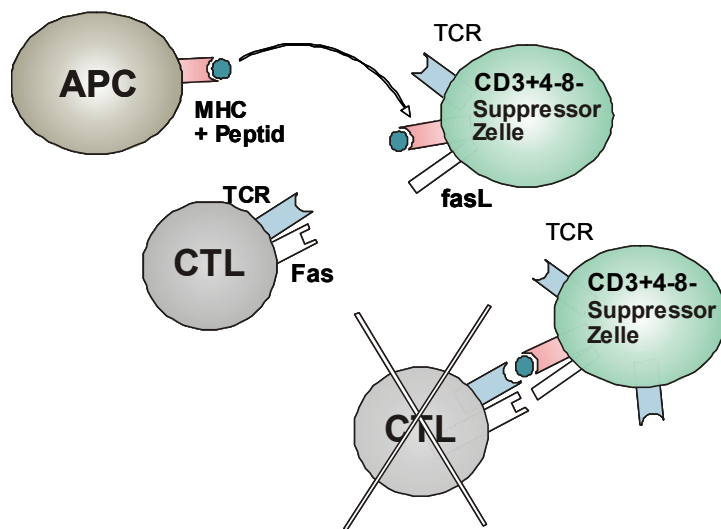


Abb. 1:
Modell der Antigen-spezifischen Toleranzinduktion nach Zhang et al. [28]. Der transferierte pMHC-Komplex dient der Suppressorzelle als Effektormolekül für die spezifische Interaktion mit einem aktivierten, zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Durch diese Kontaktaufnahme wird über den Fas/FasL Signalweg Apoptose im CTL induziert.

Zhang et al. konnten in Transwell-Experimenten eindeutig nachweisen, dass die spezifische Deletion nur über Zell-Zell-Kontakt, jedoch nicht über lösliche Faktoren vermittelt wird. Ferner ergaben Blockierungsexperimente mit einem neutralisierenden monoklonalen anti-Fas Antikörper, dass die Apoptose-Induktion Fas-abhängig verläuft. Diese zur Immunregulation befähigten DN T-Zellen finden sich im gewählten Mausmodell in einer großen Zahl in Transplantatbiopsien nicht-abgestoßener Organe. Dort scheinen sie Schutz vor einer möglichen Abstoßungsreaktion zu vermitteln [41].

2.1.3 Humane DN T-Zell Subpopulationen

Die hier präsentierte Arbeit befasst sich mit der Identifikation und Charakterisierung humaner Antigen-spezifischer Suppressorzellen. Die CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ DN T-Zellen sind in besonderem Maße dafür prädestiniert, als spezifische Suppressorzellen zu agieren. Zum einen sind die für die Aktivierung nötigen Korezeptoren CD4 und CD8 auf der Zellmembran von DN T-Zellen nicht vorhanden. Dies bedeutet möglicherweise, dass DN T-Zellen durch das Fehlen der Korezeptoren nicht für die Aktivierung determiniert sind und ihre mögliche biologische Funktion überwiegend an Regulation gekoppelt ist. Die Präsenz von DN T-Zellen in der gesamten Peripherie des Immunsystems in einer niedrigen Frequenz würde eine periphere Regulatorfunktion erlauben. Außerdem ist gezeigt, dass DN T-Zellen eine Ausstattung zur Lyse von Zielzellen besitzen [42;43], welche sie prinzipiell zur Deletion von autoimmunreaktiven Klonen befähigt.

2.1.3.1 TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN T-Zellen

Während die ontogenetische Herkunft von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht wurde, bleibt die Herkunft von peripheren DN T-Zellen weiter unklar. Die Heterogenität der Oberflächenantigene, die von verschiedenen DN T-

Zellen exprimiert werden, legt nahe, dass mehrere Reifungswege existieren. Aus Untersuchungen von Mausstämmen, die ein mutiertes Fas-Gen und eine abnormale Akkumulation von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen aufweisen, weiss man, dass DN $\text{TCR}\alpha\beta^+$ T-Zellen direkt aus CD8^+ T-Zellen hervorgehen und eine MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-I-ähnliche Selektion durchlaufen können [44-46]. Die Tatsache, dass das CD8^+ Gen in peripheren DN T-Zellen demethyliert vorliegt, spricht ebenfalls für einen engen Verwandtschaftsgrad zwischen DN und CD8^+ T-Zellen [44;47]. Es gibt weitere Hinweise dafür, dass DN und CD8^+ T-Zellen Verwandtschaft aufweisen; so können reife, murine CD8^+ T-Zellen, die mit hohen Konzentrationen von IL-4 kultiviert werden, in den DN T-Zell-Phänotyp übergehen [48]. Außerdem üben DN und CD8^+ T-Zellen eine ähnliche zytotoxische Funktion aus [49;50]. Bereits vor 20 Jahren stellte man fest, dass DN T-Zellen trotz der Abwesenheit der Korezeptoren CD4 und CD8 über den $\text{TCR}\alpha\beta$ stimulierbar sind, z.B. durch Superantigene [51].

Innerhalb der $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen befinden sich auch die sogenannten NK-T-Zellen, die sowohl NK-Marker (z.B. CD56) als auch T-Zell-Marker exprimieren. Diese Zellen scheinen sich hinsichtlich ihrer Antigenerkennung grundlegend von den herkömmlichen T-Zellen zu unterscheiden: NK-T-Zellen erkennen „Nicht-Peptid-Liganden“ wie z.B. (Glyko-)Lipide, die über CD1d-Moleküle präsentiert werden [52-56] und weisen eine ausgeprägte $\text{TCRV}\alpha 24$ -Invarianz auf. Für die hier gezeigten Versuche wurden ausschließlich CD56-depletierte $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN-T-Zellen verwendet. Jedoch ist zu erwähnen, dass es auch in dieser Nicht-NKT-Fraktion der $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen zu invarianten oder konservierten Sequenzen des $\text{TCRV}\alpha$ -Gens (v.a. $\text{TCRV}\alpha 4a$, $V\alpha 7$, $V\alpha 19$) kommt, was die Diversität der CDR3-Längen in der hochvariablen Region einschränkt [57]. Die biologische Funktion des verminderten $\text{TCRV}\alpha$ Polymorphismus ist bis dato weitgehend ungeklärt.

Frühere Versuche zur Funktion humaner $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen wurden mit IL-2 abhängigen T-Zell-Klonen durchgeführt, die aus dem peripheren Blut gesunder Individuen etabliert wurden [58]. Die T-Zell-Klone zeigten folgende funktionelle Charakteristika: T-Helferfunktion, Stimulation der Immunglobulinproduktion von B-Zellen und non-MHC-restringierte zytolytische Aktivität. Da der CD3/TCR Komplex in humanen $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen funktionell kompetent ist, jedoch in diesen Versuchen die Zytotoxizität nicht über CD3 monoklonale Antikörper blockierbar ist, wird diskutiert, dass die Zytotoxizität von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen nicht über den CD3/TCR Komplex vermittelt wird [58].

Neben der zytolytischen Funktion wurde auch die Zytokinsekretion humaner $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen untersucht: Die IL-2-abhängigen Zelllinien produzieren nach Mitogen- oder IL-1-Stimulation $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{-}\beta$ und $\text{IFN-}\gamma$ [59]. Ebenso wird nach einer Stimulation des CD3/TCR-Komplexes die Sekretion von IL-2 und $\text{IFN-}\gamma$ beschrieben [60].

Das regulatorische Potential von DN T-Zellen wurde erstmals von Strober et al. beschrieben [61;62], wobei in diesen Arbeiten vorwiegend eine NK1.1 exprimierende Subpopulation von DN T-Zellen untersucht wurde. Diese aus Mäusen isolierten Zellen hatten sowohl *in vitro* eine inhibitorische Aktivität in gemischten Lymphozytenreaktionen, als auch *in vivo* eine inhibitorische Wirkung auf die Entwicklung einer Graft-versus-Host (GVH) Erkrankung. Eine Antigen-spezifische, regulatorische Funktion von TCR $\alpha\beta^+$ DN T-Zellen aus der Milz wurde im Mausmodell von Zhang et al. nachgewiesen [28;63;64]. Auch Priatel et al. konnten im Maussystem einen Zusammenhang zwischen TCR $\alpha\beta^+$ DN T-Zellen und Antigen-spezifischer Suppression zeigen [65]. Über den Nachweis einer Antigen-spezifischen Suppression durch humane TCR $\alpha\beta^+$ DN T-Zellen wurde bisher nichts berichtet. Da der Hauptteil humaner, peripherer DN-T-Zellen den $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor exprimieren und somit TCR $\alpha\beta^+$ DN T-Zellen schlechter verfügbar sind, ist über humane TCR $\alpha\beta^+$ DN T-Zellen wenig bekannt. Lediglich in Patienten, die an dem lymphoproliferativen Syndrom erkrankt sind, konnte diese Subpopulation näher phänotypisch charakterisiert werden [66]. Bei dieser Erkrankung kommt es aufgrund einer Mutation im Gen für Fas bzw. FasLigand zu einer peripheren Akkumulation von T-Lymphozyten.

Die Bedeutung der Apoptose für die Homöostase reifer T-Lymphozyten ist vielfach bekannt. Jedoch scheinen murine DN TCR $\alpha\beta^+$ T-Zellen in hohem Maße resistent gegenüber TCR-vermittelter Apoptose zu sein [67]. Diese Tatsache hängt ursächlich mit einer Hochregulation der Apoptose-Repressoren Bcl-2 und Bcl-x_L zusammen, wobei letzterer in DN TCR $\alpha\beta^+$ T-Zellen bereits konstitutiv überexprimiert vorliegt. Darüber hinaus erwies sich IL-4 als ein besonderes, Apoptose-protectives Zytokin [67]. Auch Hamad et al. schlagen ein Modell vor, das die geringe Apoptoseempfindlichkeit von DN TCR $\alpha\beta^+$ T-Zellen erklärt: Das Fehlen der Korezeptoren, v.a. CD4, führt dazu, dass diese Zellen nicht Apoptose-sensitiv werden [68]. Der Grund dafür ist, dass die separate Ligation des CD4-Korezeptors ein Apoptose-induzierendes Signal für reife T-Lymphozyten zu sein scheint [69;70], welches bei DN TCR $\alpha\beta^+$ T-Zellen prinzipiell nicht vorhanden ist. Diese Befunde sind erste Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen, welchen die toleranzinduzierenden Zellen selber wieder unterliegen können.

2.1.3.2 TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zellen

Die bevorzugte Präsenz humaner TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen in Epithelien und an Kompartimentgrenzen, d.h. an Orten, an denen Toleranzinduktion von großer Wichtigkeit ist (z.B. Haut, Darm, Lunge), lässt vermuten, dass auch TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen in Toleranzphänomene involviert sind. In verschiedenen Arbeiten konnte eine Korrelation zwischen der Frequenz von TCR $\gamma\delta$ T-Zellen und dem „Toleranzstatus“ von Individuen gezeigt werden. Erhöhte TCR $\gamma\delta$ T-Zell-Spiegel wurden z.B. bei schwangeren Frauen [71] sowie bei nichtschwangeren Frauen in der zweiten Zyklushälfte [72] ermittelt. Diese Befunde

scheinen ursächlich mit der immunologischen Akzeptanz des Föten im mütterlichen Organismus in Zusammenhang zu stehen. Der erhöhte Toleranzstatus bei Frauen in der zweiten Zyklushälfte wird als eine Vorbereitung auf die Einnistung eines befruchteten Eies interpretiert. Hingegen wurden herabgesetzte TCR $\gamma\delta$ T-Zell-Spiegel im peripheren Blut von Asthmatikern [73], Patienten mit Lupus erythematodes [74] und primär biliärer Zirrhose (PBC) gemessen [75].

Für eine regulatorische Funktion von TCR $\gamma\delta$ T-Zellen gibt es weitere direkte Hinweise; so ist bekannt, dass murine TCR $\gamma\delta$ DN T-Zellen durch aktivierte T-Zellen stimuliert und zur Expansion angeregt werden. Dies bestätigten mehrere Gruppen, die nachweisen konnten, dass eine *in vitro*-Expansion von TCR $\gamma\delta$ T-Zellen durch die Anwesenheit von spezifisch stimulierten TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen begünstigt wird [76]. Ferner führte eine anti-CD4 Antikörperbehandlung von Mäusen in manchen Versuchsmodellen zu einer stark eingeschränkten TCR $\gamma\delta$ T-Zell Antwort [77]. Dies deutet darauf hin, dass TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen in eine Wechselwirkung mit aktivierten T-Zellen treten. Auch bei humanen TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen ist dieses Phänomen beobachtet worden: Eine erfolgreiche Expansion von TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen mit Isopentenyl-pyrophosphat konnte nur dann erzielt werden, wenn CD4⁺ T-Zellen simultan durch einen zusätzlichen Stimulus aktiviert wurden [78].

Ferner ist von mehreren Gruppen beobachtet worden, dass in Infektionsmodellen TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen zeitlich verzögert zu CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen erscheinen [79]: in Influenza- und Malaria-infizierten Mäusen scheinen die T-Zell-Subpopulationen sequenziell zu agieren. Während TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen eher in der ansteigenden Flanke des Pathogenbefalls aktiv sind, werden die TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen erst in einer späteren Phase der Erkrankung aktiv. Diese Befunde sprechen dafür, dass TCR $\gamma\delta$ T-Zellen weniger Antigen-gesteuert agieren, sondern vielmehr die Aktivität der T-Lymphozyten auf einer übergeordneten Ebene modulieren. Das lokale Auftreten von murinen TCR $\gamma\delta$ T-Zellen an Orten, an denen es zu einer Akkumulation von aktivierten TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen kommt [80], während weitere Inflammationsparameter fehlen, legt nahe, dass TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen auf aktivierte T-Zellen einwirken.

Kaufmann et al. berichten überdies [81], dass Mäuse, die mit einem monoklonalen anti-pantCR δ Antikörper behandelt wurden (somit waren für etwa 8 Tage keinerlei TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen im Lymphknoten mehr vorhanden), keine zahlenmäßige Beeinträchtigung anderer T-Zell Populationen zeigten. Jedoch akkumulieren in der Folge CD8⁺ T-Zellklone, die allogene und autologe Zielzellen erkennen und vermehrt proliferieren. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen dauerhaft zur peripheren Toleranzinduktion beitragen.

Auch humane TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen sind prinzipiell in der Lage, T-Helferzellen zu inhibieren. Bereits 1996 konnte bei Borreliose-Patienten gezeigt werden, dass TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen, die eine erhöhte FasL-Expression aufweisen, zur Apoptose-Induktion von synovialen Fas^{high} exprimierenden CD4⁺ T-Zellen fähig sind [42]. Die Synovialflüssigkeit von Lyme

Arthritis-Patienten enthielt teilweise über 15% TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen. Eine spezifische Stimulation mit Fragmenten von *Borrelia burgdorferi* führte zu einer Verschiebung der Zellzusammensetzung: Während der prozentuale Anteil der CD4 $^+$ T-Zellen stark abnahm, zeigte sich ein starker Anstieg von TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen. Ursächlich dafür ist eine Lyse der CD4 $^+$ T-Zellen durch TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen. Das beweist, dass humane TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen das Potential besitzen, andere Zellen zu lysieren.

Die Liganden und Stimulatoren von TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen sind vielfältig: Hierzu zählen u.a. Bakterienextrakte, hitzegetötete Bakterien, Lipopolysaccharide, Staphylococcus Enterotoxin A, Hitzeschockproteine, Tetanustoxoid und Nicht-Peptid-Komponenten. Auch scheinen TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen vielfach in Wechselwirkung mit anderen Immunzellen zu treten, v.a. mit B-Zellen und aktivierten T-Zellen (siehe Reviews [82;83]).

Die Tatsache, dass TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen in toleranzinduzierende Phänomene involviert sind, gilt allgemein als gesichert (Review [84]). Dennoch ist ein exakter zellulärer Mechanismus bisher nicht beschrieben worden. Ferner ist weitgehend unklar, welche Rolle humane TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zellen bei der Eliminierung von aktivierten T-Zellen in der Peripherie und somit für die Ausbildung und Gewährleistung peripherer Toleranz spielen.

2.2 pMHC-I Komplexe als Effektormoleküle

2.2.1 Die Funktion des MHC-I für Aktivierung und Toleranzinduktion

Die MHC-Klasse-I (MHC-I) Glykoproteine sind im Haupthistokompatibilitätskomplex, einer Gruppe gekoppelter Gen-loci kodiert, welche für viele Proteine exprimieren, die an der Präsentation von Antigenen gegenüber T-Zellen beteiligt sind. Das herausragendste Merkmal der MHC-Moleküle ist ihr ausgeprägter Polymorphismus, wobei die verschiedenen allelischen Varianten gehäuft Unterschiede in der Peptid-bindenden Region der MHC-Moleküle zur Folge haben. Auf diese Weise wird das Spektrum der Peptide, die an MHC-Moleküle gebunden werden können, enorm erweitert.

Mit Hilfe von MHC-I-Molekülen, welche sich auf nahezu jeder Körperzelle befinden, wird an der Zelloberfläche endogen prozessiertes Antigen präsentiert, welches zu einem großen Teil von Selbstproteinen stammt, aber auch von Fremdproteinen, z.B. von viralen Proteinen, stammt. Das auf der Zelloberfläche präsentierte Peptidspektrum gibt somit Aufschluss über den "inneren Zustand" der Zelle.

Das MHC-I-Molekül gilt als Erkennungs- und Zielstruktur für CD8 $^+$ T-Effektor-Killerzellen, welche die Eliminierung der erkannten Zellen einleiten können [85;86]. Darüber hinaus können etwa 1 - 10% aller T-Zellen eines Individuums direkt auf Nicht-Selbst-MHC-I-Moleküle reagieren [87], meist unabhängig von dem gebundenen Peptid. Dieser als *Alloreaktivität* bezeichnete Prozess erklärt, warum Gewebetransplantate nicht-verwandter Individuen in nahezu jedem Fall abgestoßen werden. Die Erkennung des pMHC-Komplexes durch T-Zellen reicht jedoch nicht für die Aktivierung von T-Zellen und die Einleitung einer Immunantwort aus. Es muss ein weiteres zweites Signal, ein sog.

kostimulatorisches Signal, von der erkannten Zelle ausgehen, damit es zu einer effektiven Immunantwort kommen kann (siehe Abschnitt 2.2.5). Wenngleich eine wichtige Funktion der Kostimulation bei der Initiierung und Erhaltung von T-Zell-Antworten bewiesen ist, so kann dennoch nur das pMHC-Molekül die Spezifität der Immunantwort vermitteln (siehe Schema Abb. 2, S. 22).

Die Schlüsselfunktion von pMHC-I-Komplexen während der zentralen negativen Selektion von T-Zellen im speziellen Milieu des Thymus ist bekannt [88;89]. In diesem Zusammenhang konnte bewiesen werden, dass Thymozyten, welche an MHC-I-Moleküle gebundene ubiquitäre Autoantigene erkennen, eliminiert werden. Selbst-Peptid:Selbst-MHC-Komplexe im Thymus befreien somit das T-Zell-Repertoire von unreifen T-Zellen, die autoreaktive Rezeptoren tragen. Wenn jedoch körpereigene Proteine in einer sehr geringen Konzentration exprimiert werden, kann es vorkommen, dass die klonale Deletion der sie erkennenden autoreaktiven T-Zellen unterbleibt. In diesen Fällen kommt es oft zu einer stillen Persistenz von autoreaktiven T-Zellen in Gegenwart des entsprechenden Autoantigens, was als immunologische Ignoranz bezeichnet wird [90]. Da der genaue Mechanismus der Thymusselektion bisher noch nicht vollständig geklärt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Deletionsprozesse des Thymus und der Peripherie auf ähnlichen Mechanismen beruhen.

Neben ihrer Funktion als Zielstrukturen für aktivierte CD8⁺ T-Zellen sind MHC-I-Komplexe außerdem maßgeblich in Prozesse der peripheren Toleranzinduktion involviert. Schon ihre Funktion als Präsentationsmoleküle für Selbstantigene legt diese Eigenschaft nahe. Geissler et al. konnten in einer Serie von Versuchen nachweisen, dass lösliche MHC-I-Komplexe im Mausmodell in der Lage sind, Toleranz zu vermitteln. Die Arbeitsgruppe fand, dass Spender-Hepatozyten in allogenen Lebertransplantaten große Mengen lösliches pMHC-I abgeben, und damit einen Angriff von alloreaktiven T-Zellen unterbinden können [91;92]. Dieser Befund kann erklären, weshalb Lebertransplantate tolerogene Eigenschaften haben und sogar protektiv auf kotransplantierte Spenderorgane anderer Gewebe wirken können. Eine Präsenz von löslichem, allogenem pMHC-I in vivo führt in Ratten zu einer verringerten Anzahl allospezifischer CTL. Der Grund dafür, so ergaben phänotypische Analysen der CTL, ist eine erhöhte Apoptose in CD8⁺ Splenozyten [93]. Im Tiermodell konnte dieselbe Arbeitsgruppe erfolgreich einen gentherapeutischen Ansatz mit löslichen allogenem pMHC-Komplexen zur Toleranzinduktion in Transplantationsmodellen etablieren [94-96].

Während die toleranzinduzierende Funktion löslicher pMHC-Komplexe eindeutig nachgewiesen werden konnte, ist eine mögliche toleranzinduzierende Funktion membranständiger pMHC-I Komplexe deutlich schwieriger zu beurteilen. Der Grund hierfür liegt in der Interaktion von unterschiedlichen Todesrezeptoren auf der pMHC-tragenden Zelle, die bei der Apoptose-Induktion von Bedeutung sein können (siehe hierzu Abschnitt 2.2.4, S. 23). Eine Involvierung membranständiger pMHC-Komplexe in

Suppressoreffekte ist jedoch anhand der sog. "Veto-Zellen" nachgewiesen: Das Veto-Konzept wurde ursprünglich von Miller et al. entworfen und besagt, dass Alloantigen-präsentierende Zellen diejenigen allo-reaktiven Zellen, welche sie erkennen, inhibieren [97]. Dieser Prozess ist spezifisch und involviert das pMHC-Molekül. Mehrere Veröffentlichungen, die von derselben Arbeitsgruppe zwischen 1979 und 1983 veröffentlicht wurden, beschreiben eine spezifische Inhibition in der Generierung von CTL durch Zellen, welche die gleichen pMHC-Komplexe wie die Stimulatorzellen aufweisen. Eine Veto-Aktivität wurde inzwischen für Zellen verschiedener Gewebe wie z.B. Knochenmark [98;99], Milz [100], fötale Leber [101] und Lymphknoten [102] nachgewiesen. Auch für Phospholigand-aktivierte und expandierte TCR $\gamma\delta$ Zellen ist eine Veto-Aktivität beschrieben [103]. Daraus ist ersichtlich, dass die Veto-Aktivität *per se* nicht auf eine spezielle zelluläre Entität beschränkt ist, sondern vielmehr eine konstitutive immunregulatorische Eigenschaft einer ganzen Reihe von Zellen ist [104]. In allogenen Versuchen ist damit in einer Reihe von Experimenten der letzten 30 Jahre gezeigt, dass der pMHC-Komplex auf den Stimulatorzellen auch eine Suppressorfunktion gegenüber Stimulator-Zell-reaktiven Zellen hat.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit steht ein Modellsystem im Mittelpunkt, welches für den pMHC-I-Komplex auf murinen CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ DN T-Zellen eine Antigen-spezifische, toleranzinduzierende Funktion postuliert [28]. Die Suppressorzelle nimmt über den pMHC-I-Komplex Kontakt zu einer Antigen-spezifischen, aktivierten T-Zelle auf und induziert deren Deletion. In diesem Modell konnte durch Blockierungsversuche nachgewiesen werden, dass an der Apoptose-Induktion von T-Zellen das Rezeptorpaar Fas/FasLigand beteiligt ist.

2.2.2 Modifizierung der MHC-Beladung *in vitro*

Seit langem ist bekannt, dass der Großteil MHC-I-präsentierter Peptide aus dem Cytosol stammt. Dort werden die Proteine von einer multikatalytischen Protease, dem Proteasom, in Peptide abgebaut und im endoplasmatischen Reticulum auf MHC-I-Moleküle geladen. An der korrekten Peptidassoziation an das MHC-I-Molekül ist eine Reihe von Hilfsproteinen beteiligt [105;106]. Das Peptid-beladene MHC-I-Molekül wird nun an die Zelloberfläche transportiert. Dennoch gibt es die Möglichkeit, die Peptidbeladung der MHC-I-Moleküle an der Zelloberfläche *in vitro* zu modifizieren. Dabei wird den Zellen synthetisiertes freies Peptid mit einer optimalen Länge von 8 - 10 Aminosäuren im starken Überschuss zugegeben. Bei gleichzeitiger Darreichung von β_2 -Microglobulin kommt es zu einer Stabilisierung der pMHC-I-Komplexe, wodurch die Beladungseffizienz vor allem bei niedrigen Peptidkonzentrationen gesteigert wird [107]. Ferner wirkt sich sowohl eine möglichst kurze Aminosäuresequenz des Peptids als auch eine hohe Peptidkonzentration günstig auf die Beladungseffizienz der membranständigen MHC-I aus [107]. Für okta- und nonamer-Peptide konnte gezeigt werden, dass bei einer Konzentration von $> 0,1 \mu\text{M}$

bereits eine Assoziation an membranständige MHC-I-Komplexe ohne Zugabe von β 2-Mikroglobulin und ohne metabolische Energie der Zelle stattfindet [107]. Es gibt jedoch einen weiteren Pathway für exogene Peptide, auf ein MHC-I-Molekül zu gelangen: Es konnte gezeigt werden, dass exogene Peptide in ER Kompartimente eindringen können und dort an *de novo* synthetisierte MHC-I-Moleküle binden, ohne dass dabei der Golgi-Apparat oder das Cytosol durchlaufen werden. Da Pinozytose-Inhibitoren diesen Prozess unterbinden, geht man von einem vesikulären Transportweg für kleine extrazelluläre Substanzen zum ER aus [108].

Ein entscheidender Faktor für die Konkurrenz von Peptiden um die MHC-I-Bindungsstelle ist die Affinität der Peptide. Wie man aus vergleichenden Beladungsstudien z.B. mit dem Melanozyten-Differenzierungsantigen Melan-A weiß, sind Peptide mit einer höheren Affinität (z.B. ELAGIGILTV Melan-A) zur Bindungsstelle in der Lage, Peptide mit einer niedrigen Affinität (z.B. EAAGIGILTV Melan-A) von der Bindungsstelle zu verdrängen [109]. Es sind jedoch auch Zelllinien beschrieben, z.B. RMA-S oder T2, welche durch einen Defekt im Peptidtransporter TAP in ihrer MHC-I-Beladung defizient sind. In T2 Zellen, welche in dieser Arbeit Verwendung finden, können die Peptide nicht in das endoplasmatische Reticulum eindringen, wodurch es zu einer Akkumulation von unbeladenen MHC-I-Komplexen in Golgi-Kompartimenten und der Zelloberfläche kommt. Diese membranständigen MHC-I-Komplexe mit leeren Bindungstaschen können nun jedoch sehr effizient exogen durch Zugabe von Peptiden beladen werden [109]. Hier wurde auch für das in dieser Arbeit verwendete hochaffine ELAGIGILTV Melan-A gezeigt, dass es exogen über Konkurrenz an den MHC-I von Zellen assoziieren kann, ohne die Notwendigkeit einer endogenen Prozessierung. Im Gegensatz dazu sind niedrig-affine Peptide von der MHC-I *de novo*-Synthese und dem vesikulären Transport abhängig [109].

2.2.3 Die spezifische Antigen-Erkennung durch den TCR

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist ein hochvariables Transmembranglycoprotein, das der T-Zelle zur Antigenerkennung dient. Der TCR ist ein Multiproteinkomplex aus variablen Proteinen, die das Antigen erkennen, und unveränderlichen Proteinen, die für die Signalweiterleitung zuständig sind. Das T-Zell-Rezeptor-Heterodimer besteht aus den beiden Transmembranglykoproteinketten α und β (siehe Schema Abb. 2). Der extrazelluläre Teil jeder Kette besteht jeweils aus einer membran näheren, konstanten (C-)Region und einer variablen (V-)Region am Aminoterminus. Für die spätere variable Region codieren V, J und D (nur bei der β -Kette) Gensegmente, welche sich in jeder T-Zelle während der T-Zell-Entwicklung im Thymus durch somatische Rekombination zu vollständigen V-Exons umordnen und zusammen für die spätere variable Region kodieren. Da die einzelnen Gensegmente in geringfügig unterschiedlichen Versionen vorkommen, kommt es durch die zufällige Auswahl der Gensegmente beim

Zusammenbau zu einer hohen Diversität. Eine weitere Quelle der Diversität ist ein ungenauer Verknüpfungsmechanismus der einzelnen Segmente. Diejenigen Stellen der DNA, welche später für die hypervariablen CDR3-Schleifen codieren, sind am variabelsten. Da das Zentrum der Antigenbindungsstelle von den hypervariablen CDR3-Schleifen geformt wird, kann eine große Vielzahl von Antigenen erkannt werden. Aufgrund der somatischen Umorganisation der TCR-Gene exprimiert jede T-Zelle nur eine einzige Art von TCR, was sie zu einer hochspezialisierten Immunzelle macht.

An der erfolgreichen Wechselwirkung zwischen den extrazellulären Domänen von TCR und pMHC-Komplex sind außerdem Adhäsionsmoleküle wie Leukozytenintegrine (z.B. LFA-1) und die interzellulären Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM 1,2,3) beteiligt (siehe Schema, Abb. 2). Die TCR-pMHC Interaktion, welche sich durch eine eher niedrige Affinität auszeichnet, wird (Killerzelle) stabilisiert, wobei nicht genau geklärt ist, ob die akzessorischen Moleküle ein energetisch günstigeres Andocken des TCR ermöglichen, oder ob durch ihre Interaktion Konformationsänderungen stattfinden [110].

Aus einer polyklonalen T-Zell-Population, die während einer akuten Infektion *in vivo* von den auf der T-Zelle exprimierten akzessorischen Molekülen CD4 (Helferzelle) und CD8 (*vivo* expandiert, wachsen bevorzugt hochaffine T-Zell-Klone aus, wodurch es zu einer Affinitätssteigerung bzgl. des pMHC-Moleküls innerhalb der T-Zell-Population kommt [111]. Die spezifische Erkennung des Antigens z.B. auf einer APC durch den TCR bewirkt sowohl bei der T-Zelle als auch der Zielzelle weitreichende membran- sowie cytosolische Umorganisationsprozesse. Hierzu zählen z.B. Clusterbildung [112;113], die Reorganisation von Membrandomänen [114;115], bis hin zur Beteiligung des Cytoskeletts [116]. Ein noch wenig verstandener Prozess ist der Transfer von MHC-Molekülen von der APC auf die T-Zelle, der nach einem Antigen-spezifischen Kontakt beschrieben wird [35;117]. Weitere Aktivierungssignale erhält die T-Zelle über die Bindung des CD40-L an CD40 auf der APC [118].

Man nimmt an, dass der permanente Internalisierungs- und Recyclingprozess von TCR Molekülen einer unstimulierten Zelle nach spezifischer Antigenerkennung sofort zum Erliegen kommt. Aufgrund dieses fehlenden TCR-Rücktransportes auf die Zelloberfläche kann eine scheinbare Herunterregulation von TCR nach spezifischer Stimulation verzeichnet werden [119]. Dieser Zustand, welcher mit verschiedenen Methoden nachgewiesen wurde, erschwert das Monitoring von spezifischen, stimulierten T-Zellen [120-122]. Dieser Mechanismus könnte als möglicher Schutz der T-Zelle vor Überstimulation interpretiert werden.

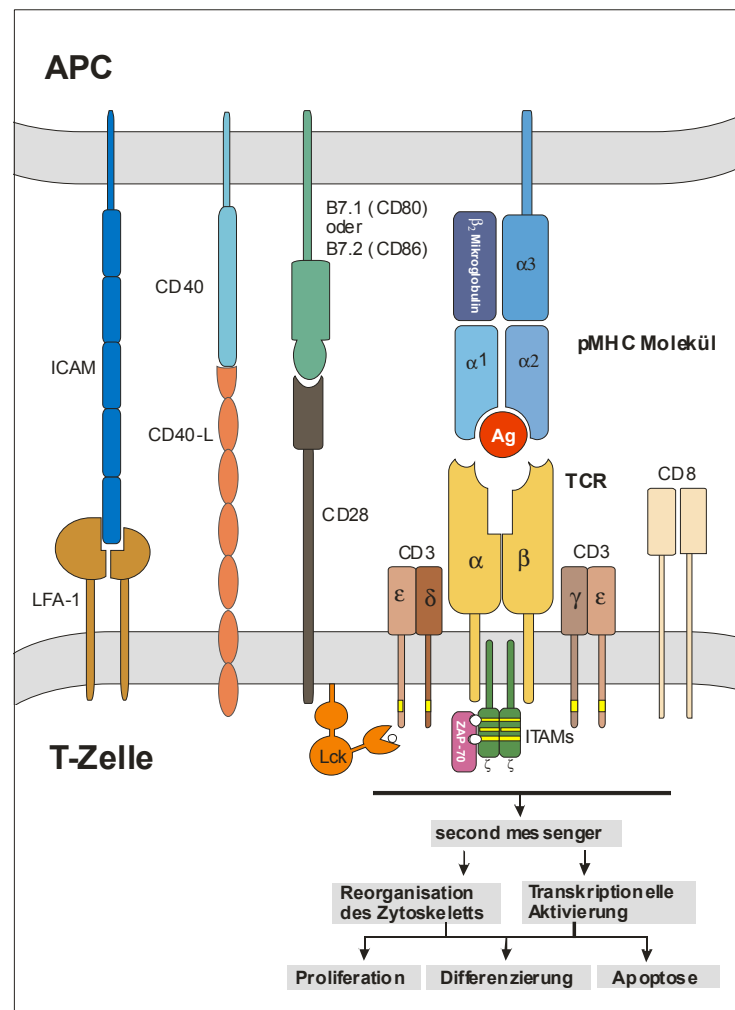


Abb. 2: Molekularer Aufbau von TCR- und pMHC-Komplex. Modifiziert nach [123]

Man weiss inzwischen, dass nur sehr wenige TCR für die erfolgreiche Interaktion einer T-Zelle mit einer APC notwendig sind. Die Interaktion zwischen dem TCR und dem pMHC weist in der Regel eine niedrige Affinität sowie eine hohe Dissoziationsrate auf, wodurch, wie von A. Lanzavecchia et al. beschrieben, ein einzelnes pMHC-Molekül nacheinander 200 TCR Moleküle ligieren kann [124]. Seit 1996 steht die Tetramer-Technologie als Methode zur Detektion Antigen-spezifischer T-Zellen zur Verfügung. Sie ist bis heute die Methode der Wahl zur Erfassung und Visualisierung Antigen-spezifischer T-Zellen in Kombination mit phänotypischen Analysen, Proliferations- und Apoptose-Tests, Zytokinsekretionstests, Intrazellulärfärbungen usw. (z.B. Review [125]). Bei MHC-Tetrameren handelt es sich um vier einzelne rekombinante, rückgefaltete, biotinylierte MHC-Moleküle, die über ein Streptavidinmolekül ein Tetramer bilden. Die MHC-Moleküle enthalten jeweils ein einziges definiertes Peptid-Epitop und binden sehr effizient an T-Zellen, deren Rezeptoren für den eingesetzten pMHC-Komplex spezifisch sind. Durch die vier gleichzeitig bindenden pMHC-Komplexe des Tetramers wird die normalerweise sehr schwache Wechselwirkung zwischen TCR und pMHC verstärkt und das Problem der sehr schwachen Bindungsaffinität umgangen.

Die Hauptanwendung von Tetrameren besteht in der Detektion und Visualisierung Antigen-spezifischer T-Zell-Subpopulationen. Die funktionelle Wirkung von Tetrameren auf aktivierte T-Zellen stand bisher eher im Hintergrund. Dennoch gibt es einige Arbeiten über die funktionellen Eigenschaften von Tetrameren. Diese zeigen, dass pMHC-Komplexe in Form von Mono-, Di-, Tri- oder Tetrameren in der genannten Reihenfolge zunehmend aktivierende Wirkung auf T-Zellen haben [126]. Die Phosphorylierung der TCR ζ -Kette, ein frühes Zeichen der T-Zell-Aktivierung, ist für diese Oligomere in ebendieser Reihenfolge konsistent gezeigt [127]. Durch die Verwendung mutierter pMHC-Oligomere kann außerdem die Funktion verschiedener Domänen innerhalb des pMHC-Komplexes für T-Zell-Aktivierung und Signaltransduktion untersucht werden [127]. Auch deren apoptotische Eigenschaften auf CD8⁺ CTL wurden mit Hilfe von Tetramer-beschichteten Beads untersucht: Tetramer-Beads konnten mit ansteigendem Beads : CTL Verhältnis Apoptose in den CTL induzieren [128]. Diese Versuche sind deswegen von großem Interesse, weil in einem Zielzell-freien System in Abwesenheit von Adhäsionsmolekülen, Todesrezeptoren und akzessorischen Stimuli gezeigt werden konnte, dass pMHC-Moleküle Apoptose induzieren können. Auch Takahashi et al. konnten zeigen, dass H-2D(d)/P18-I10 Tetramere in HIV-envelope-spezifischen CTL Apoptose induzieren können. Dieser Mechanismus scheint Caspase-3-abhängig zu sein, jedoch scheinen Fas/FasL und TNF- α bei der Apoptose-Induktion keine Rolle zu spielen [129].

2.2.4 Aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) von T-Zellen

Während der zentralen, negativen Selektion im Milieu der Thymusdrüse ist der pMHC-Komplex maßgeblich an der Deletion autoimmunreaktiver T-Zell-Klone beteiligt [88;89]. Über den Mechanismus der Thymusselektion wird noch spekuliert. Anfangs wurde für das Rezeptorpaar Fas (Apo-1)/Fas-Ligand (FasL) eine führende Rolle postuliert. Da jedoch Fas-defiziente (lpr) Mäuse über eine normale negative Selektion verfügen und keine Abnormitäten des T-Zell-Rezeptor-Repertoires aufweisen [130], ist inzwischen klar, dass es andere Mechanismen der zentralen Thymusselektion geben muss. Der Zelltod-induzierende Rezeptor TRAIL scheint in die negative Selektion involviert zu sein [131], jedoch ist dessen genaue Rolle noch nicht geklärt [132]. Neuere Untersuchungen zur Apoptose thymusständiger T-Zellen legen eine starke Beteiligung des Moleküles *Bim* (ein Vertreter der bcl-2 Familie) während der negativen Selektion nahe: Die Ligation des TCR führt zu einer Hochregulation der *Bim*-Expression und fördert deren inhibitorische Eigenschaften gegenüber anti-apoptotischen Molekülen [133]. Dieser molekulare Zusammenhang deutet darauf hin, dass die Rolle des pMHC-Komplexes im Thymus möglicherweise nicht nur die Vermittlung der Spezifität ist, sondern dass er darüber hinaus der essentielle Initiator der Thymozyten-Selektion sein könnte.

Auch in der Peripherie wird dem "Aktivierungsinduzierten Zelltod" (AICD) für die Homöostase von T-Zellen [134], die klonale Deletion aktivierter T-Zellen (Review [135]) und die Herunterregulation von Immunantworten [136] eine große Bedeutung beigemessen. Die Grundlage des AICD ist die Apoptose-Induktion in aktivierten T-Zellen über einen Todesrezeptor. Im eigentlichen Sinn versteht man in der Literatur unter AICD die Apoptose-Induktion über den Fas/FasL Signalweg (Review [137]), obwohl an der Vermittlung des Zelltodes von aktivierten T-Zellen neben FasL weitere Apoptose-induzierende Faktoren beteiligt sein können: Dies sind vor allem weitere Vertreter der TNF-Superfamilie wie TNF- α [138] und TRAIL (Apo-2) [139], jedoch wird vereinzelt auch Perforin eine Rolle beim AICD zugesprochen [140]. Fas und TNFR vermitteln ihre apoptotische Wirkung über die Aktivierung von Caspasen, eine Familie von cytosolischen Cysteinproteasen. Die Oligomerisierung der Rezeptoren führt zur Aktivierung der Caspase-8, welche ihrerseits wiederum Caspase-3 spaltet und aktiviert. Durch Caspase-3 werden direkt apoptotische Veränderungen der Zelle eingeleitet. Eine Dysregulation dieser Todeswege kann zu Lymphadenopathien [141] und zu Autoimmunerkrankungen führen.

Als die Expression von Todesrezeptoren in vielen verschiedenen Geweben (Auge [142], Testis [143], Gehirn [144], Tumoren [145-147]) entdeckt wurde, wurde sie als ein wichtiger Feedback-Mechanismus der Immunregulation angesehen. In neuerer Zeit jedoch herrscht über die reale Bedeutung dieser sog. "Counterattack"-Theorie, dass nämlich verschiedene Gewebe wie z.B. auch Tumoren aktivierte T-Zellen mit Hilfe der Todesrezeptoren ausschalten können, eine geteilte Meinung. Die Gründe dafür sind vielfältig: Erstens gibt es viele FasL⁺ Tumoren, die nicht immunprivilegiert sind und abgestoßen werden können [148;149], zweitens ist vielfach beschrieben, dass Fas⁺ T-Zellen resistent sein können gegenüber der Signalvermittlung über FasL [150;151], drittens weisen neuere Arbeiten FasL sogar eine immunstimulierende Funktion zu [152;153], und viertens wurde inzwischen für einige Gewebe gezeigt, dass ihr Schutz vor Immunangriffen nicht auf Fas/FasL-Wechselwirkung zurückführbar ist [154;155].

Neuere Arbeiten lassen vermuten, dass die Wechselwirkungen von Fas/FasL komplexer sind, als zunächst angenommen. Dabei kommt der Wechselwirkung zwischen TCR und pMHC eine gesteigerte Rolle zu: Li et al. konnten zeigen, dass Tumorzellen aktivierte T-Zellen weniger durch die Präsentation von eigenem FasL ausschalten, sondern dass dabei ein anderer Mechanismus viel wesentlicher ist: Aktivierte T-Zellen werden nach einer Antigen-spezifischen Erkennung von Tumorantigenen auf der Tumorzelle sensitiv für Fas/FasL-vermittelte Zellyse durch benachbarte aktivierte T-Zellen. Es ist somit nicht der Tumorzell-eigene FasL, welcher die T-Zelle lysiert, sondern jener der benachbarten T-Zellen. Eine Voraussetzung für diese Form des AICD ist jedoch die Antigen-spezifische Erkennung der Tumorzelle [155;156].

FasL kann auch durch Matrix-Metalloproteinasen von Zelloberflächen abgespalten werden. Diese lösliche Form des FasL (sFasL) hat eine reduzierte Effizienz bei der Apoptose-Induktion von Fas⁺ Zellen [157;158].

Neuere Untersuchungen in verschiedenen Mausmodellen zeigen, dass "Zytokindeprivation" [159] und Todesrezeptor-vermittelter AICD nicht zur Erklärung aller Formen des T-Zell-Todes herangezogen werden können. Experimente mit Fas- oder FasL-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass auch ohne diese Moleküle eine Herunterregulation von Immunantworten möglich ist. In knock-out Mausmodellen konnten Reich et al. unter Verwendung von transgenen Mausstämmen, die weder TNF, noch TNF-R1 oder Fas besitzen, nachweisen, dass die Apoptose von T-Zellen nach einer Virusinfektion (T cell clearance) auch ohne Beteiligung des Fas- und TNF-R1-Signalweges stattfinden kann [160]. Auch Davidson et al. beschreiben, dass Fas/FasL-knock-out-Tiere zwar eine erhöhte Apoptoseresistenz aufweisen, jedoch trotzdem ein signifikanter Anteil von CD8⁺ Zellen in Apoptose geht [161]. Die Superantigen-induzierte Deletion reifer T-Zellen *in vivo* scheint außerdem ohne die Beteiligung von Fas oder TNFR stattzufinden [162]. Auch in Transplantationsmodellen scheint unter Bedingungen einer kostimulatorischen Blockade die Induktion, Proliferation und folgende Elimination von T-Zellen ohne die Beteiligung von Fas abzulaufen [163;164]. Deshalb wird vermutet, dass es weitere aktive, von Todesrezeptoren unabhängige Mechanismen der T-Zell-Apoptose gibt.

Es gibt verschiedene Ansätze, AICD in T-Zellen zu initiieren. Hierzu gehören die Ansätze mit Peptid-Agonisten. Wei et al. konnten zeigen, dass kleine Sequenzänderungen bei Peptiden in T-Zellen nicht nur zwischen Aktivierung und Apoptose entscheiden können [165], sondern außerdem unterschiedliche Apoptoseprogramme in T-Zellen induzieren können [166]: Es wurden für diese Untersuchungen T-Zellen verwendet, die spezifisch das Peptid IVTDFSVIK erkennen. Während C1R Zellen, welche das Peptid IVTDFSVIK präsentieren, Apoptose induzieren, die Fas-abhängig ist und durch DEVD-FMK (ein Caspase-3 Inhibitor) blockierbar ist, wird durch IVTDYSVIK ein langsamerer Apoptoseprozess eingeleitet, welcher weder durch anti-Fas Antikörper noch durch DEVD-FMK blockierbar ist.

Außerdem gibt es Ansätze zur Apoptose-Induktion aktivierter T-Zellen mit löslichen MHC-Molekülen [91;167;168]. Zavazava und Krönke konnten 1996 zeigen, dass lösliche HLA-Moleküle Apoptose in alloreaktiven CTL induzieren [167]. Es konnte auch gezeigt werden, dass nicht nur "klassische HLA-Moleküle" (HLA-A, -B, -C) Apoptose induzieren, sondern auch sog. "nicht-klassische HLA-Moleküle" (z.B. HLA-G) - welche sich durch eine strengere Geweberestriktion auszeichnen und eine eingeschränkte Polymorphie haben - Apoptose in CD8⁺ CTL induzieren können [169]. Bei diesem Prozess, so postulieren die Autoren, ist die Ligation des CD8-Moleküls von wesentlicher Bedeutung.

Apoptose-Induktion kann außerdem erreicht werden durch eine Ligation des TCR mittels Antikörpern wie anti-CD3 [170-172] oder anti-TCR-Antikörper [170;172]. Die Ligation an den TCR reicht aus, um ein apoptotisches Signal in der aktivierten T-Zelle auszulösen.

2.2.5 Funktion der kostimulatorischen Moleküle

Für die optimale Induktion und Expansion von CD8⁺ T-Zellen ist neben der Bindung des TCR an den spezifischen pMHC-I-Komplex (Signal 1) ein unspezifisches, kostimulatorisches Signal (Signal 2) notwendig. Die am besten charakterisierten kostimulatorischen Moleküle sind die strukturell verwandten Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), welche vorwiegend auf professionellen APC vorkommen und das T-Zell-Wachstum anregen (siehe Schema, Abb. 2). Zellen, die mit den Genen für die B7-Moleküle transfiziert werden, können die klonale Vermehrung von T-Zellen stimulieren [173;174].

Es gibt viele Hinweise darauf, dass die Entstehung von Autoimmunerkrankungen ursächlich mit der Expression von kostimulatorischen Molekülen auf dem Zielgewebe zusammenhängt. Dadurch kann es zu einer Aktivierung von autoimmunreaktiven T-Zell-Klonen kommen, z.B. im Rattenmodellsystem zur Ausbildung von EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis), einem bekannten Tiermodell für Multiple Sklerose (MS) [175]. Ein möglicher Zusammenhang zwischen erhöhter Kostimulation und fortschreitender MS deutet sich auch bei phänotypischen und funktionellen Analysen des Blutes von MS-Patienten an [176]. Im Tiermodell wurde außerdem für Lupus-Nephritis [177] sowie für die autoimmunbedingte Uveitis die B7-Kostimulation als eine wichtige Ursache nachgewiesen [178]. Es gibt neben den genannten Beispielen diverse Hinweise für die Beteiligung von kostimulatorischen Molekülen an der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen (z.B. Review [179]).

Der Ligand für CD80 und CD86 auf der T-Zelle ist das CD28 Molekül, das wie seine beiden genannten Bindungspartner ebenfalls zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Es gibt auch inhibitorische Liganden auf der T-Zelle, wie z.B. CTLA-4, welches bei Ligation mit den B7-Molekülen anstelle eines aktivierenden ein inhibitorisches Signal in die T-Zelle sendet und somit für eine Limitierung der Lymphozytenproliferation sorgt [180;181].

Die Modifizierung des kostimulatorischen Signals zu therapeutischen Zwecken, sowohl im Hinblick auf eine Stimulation als auch auf eine Inhibition der Immunantwort (z.B. Antikörperblockade von kostimulatorischen Molekülen, Förderung des CTLA-4 Signalwegs, Hochregulation der B7.1-Expression), birgt ein großes Potential für immunologische Problemstellungen der allogenen Transplantation, Tumorbekämpfung und Autoimmunerkrankungen (Review [182]).

Zunächst wurde die herausragende Rolle der Kostimulation während der Induktionsphase von T-Zellen, bzw. deren große Bedeutung für das Zustandekommen einer Immunantwort *in vivo* beschrieben. Darüber hinaus gibt es jedoch auch Hinweise für eine Funktion kostimulatorischer Moleküle für die Erhaltung einer Immunantwort

und somit eine Wirkung des Kostimulus auf T-Effektorzellen. Ramarathinam et al. beobachteten, dass dieselbe CTL-Linie B7/BB1-transfizierte J558-Zellen 10 bis 80 mal effizienter lysieren kann als untransfizierte J558-Neo Zellen [183]. Dieser Effekt ist reversibel, wenn man eine B7/BB1-Blockade durchführt. Erstmals konnten Chang et al. 1999 stichhaltig in einem *in vivo* Modell mit Mäusen die Wirkung der Kostimulation auf T-Effektorzellen demonstrieren: Autoimmunreaktive T-Effektorzellen verursachten, wenn sie in eine B7-1/B7-2^{-/-} knock out Maus adoptiv transferiert wurden, signifikant weniger Gewebeschäden bei einem leichteren und kürzeren Krankheitsverlauf, als wenn aktivierte T-Effektorzellen in Wildtyp-Empfängermäuse transferiert werden [184]. Diese Resultate zeigen, dass das kostimulatorische Signal auch für die Effektorphase einer Immunantwort eine starke Bedeutung hat, und - wie demonstriert wurde - eine Autoimmunerkrankung schwerer verlaufen kann, wenn während der Aktion von T-Effektorzellen ein kostimulatorischer Hintergrund vorhanden ist. Auch in den Arbeiten von Matsumoto et al. mit Leukämie-spezifischen T-Zellen zeigte sich, dass HEL Zellen (humane erythroleukämische Zelllinie), welche mit CD80 transfiziert wurden, gute T-Zell-stimulatorische Eigenschaften aufwiesen. Darüber hinaus zeigte sich, dass zwar die induzierten T-Zellen CD80-negative und CD80-positive HEL-Zielzellen gleichermaßen gut lysieren können, dass jedoch für eine andauernde Proliferation der T-Zellen nur CD80-transfizierte HEL Zellen geeignet waren [185]. Die Autoren folgerten daraus, dass die Kostimulation auch für eine laufende Immunantwort von Tumor-reaktiven T-Zellen eine bedeutende Rolle einnimmt, und dass ein Fehlen von kostimulatorischen Molekülen eine Möglichkeit des "Immune-escapes" von Tumoren sein kann.

Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die Kostimulation die Apoptose von T-Zellen verhindern kann. Daniel et al. fanden schon 1997, dass aktivierte CTL die Mamma-Karzinom-Zellen MCF-7 zu lysieren vermögen, anschließend jedoch einen apoptotischen Zelltod sterben. Eine B7.1-Transfektion der MCF-7 Zellen verhindert die Apoptose der CTL größtenteils [186]. Weiter konnten Li et al. zeigen, dass Mäuse, welche ein Lebertransplantat erhalten und mit FLT-3-Ligand (FL-3), welches einen starken Anstieg der Frequenz von dendritischen Zellen in der Leber verursacht, behandelt wurden, dieses Transplantat schnell (Tag 5) abstießen. Im Gegensatz dazu führt eine Blockade von CD80/CD86 zu einer vermehrten Apoptose von CD8⁺ Zellen im Transplantat und der Milz und zu einer geringeren Abstoßungsrate. Das Überleben von Transplantaten scheint somit ursächlich gekoppelt zu sein an die Apoptose von Transplantat-reaktiven T-Zellen, wohingegen eine vermehrte Kostimulation (in diesem Fall vermittelt durch infiltrierende DC der Leber) deren Apoptose verhindert und zur rascheren Abstoßung führt [187]. Eine weitere Arbeit von Noel et al. unterstreicht die Funktion des Kostimulus für das Überleben von T-Zellen: Die Ligation der kostimulatorischen Moleküle mit dem CD28 auf der T-Zelle induziert Bcl-xL, ein anti-apoptotisches Protein in der T-Zelle [188].

Am umfassendsten wurde ein Zusammenhang zwischen peripherer Toleranzinduktion und fehlender Kostimulation bereits 1994 von P. Matzinger diskutiert [189]. Demnach findet die periphere „Tolerisierung“ von T-Zellen durch die permanente Passage von T-Zellen durch das nicht-stimulatorische Gewebe des Körpers (non-APCs) statt.

2.3 Fragestellung

Im Fokus dieser Arbeit steht die periphere Toleranzinduktion des adaptiven Immunsystems. Dieses Projekt soll Beiträge für folgende wichtige Kernfragen liefern: Welche Möglichkeiten hat der Organismus, persistierende, potentiell auto-immunreaktive T-Zell-Klone unter Kontrolle zu halten? Über welche Mechanismen können diese auto-reaktiven T-Zell-Klone ausgeschaltet werden? Was geschieht am Ende einer erfolgreichen Immunantwort mit der Masse an expandierten, aktivierten T-Zellen? Gibt es eine Gegenregulation zur Begrenzung einer überschießenden Immunantwort?

Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung hochspezifisch agierender Suppressorzellen, die in der Lage sind, Antigen-spezifisch aktivierte T-Zellen zu deletieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die immunregulatorische Funktion von CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ doppeltnegativen (DN) T-Zellen, einer niederfrequenten, wenig charakterisierten Subpopulation humaner T-Lymphozyten, untersucht werden. Die Arbeitshypothese orientiert sich dabei an einem Modell, welches von Zhang et al. kürzlich aufgestellt wurde. Darin werden zwei Kernfunktionen muriner DN T-Zellen beschrieben: Erstens ein Transfer von pMHC-I Komplexen von Antigen-präsentierenden Zellen auf DN T-Zellen, und zweitens ein Einsatz dieser akquirierten pMHC-Komplexe als Effektormoleküle auf der Zelloberfläche von DN T-Zellen zur Deletion Antigen-spezifischer T-Zellen. Diese beiden Schlüsselfunktionen sollten bei humanen DN T-Zellen charakterisiert werden.

Weiter sollte analysiert werden, ob DN T-Zellen zu der in der Literatur für verschiedene Zelltypen beschriebenen "Veto-Aktivität" in der Lage sind, und ob dieser Effekt auf pMHC-Komplexe, die als Effektorstrukturen fungieren, zurückführbar ist. Hierfür wurde in gemischten Lymphozytenreaktionen untersucht, ob der Verwandtschaftsgrad zwischen Suppressorzellen und Stimulatorzellen ein wesentlicher Parameter ist. Außerdem wurde untersucht, ob die Veto-Aktivität der Suppressorzellen von DN T-Zellen durch eine Vorkultur mit pMHC-Donoren erworben werden kann.

Im zweiten Teil der vorgelegten Arbeit sollte ein Modellsystem für Antigen-spezifische Suppression etabliert werden. Es sollte eine Effektorzelllinie gefunden werden, welche gegen Antigen-spezifische T-Zell-Linien beliebiger Herkunft und Spezifität als Suppressorzelle eingesetzt werden kann. In einem solchen System sollte die Suppressorzelle über pMHC-Moleküle eine Antigen-spezifische Deletion von aktivierten T-Zellen einleiten.

Die praktische Herausforderung dieser Arbeit bestand in der Etablierung von Aufreinigungsmethoden einer sehr niederfrequenten Zellpopulation aus dem peripheren Blut und der Entwicklung von "Read-out-Systemen" zur Untersuchung von Apoptoseeffekten. Ziel dieser Promotionsarbeit ist eine Erweiterung des Verständnisses

der peripheren Toleranzinduktion im adaptiven humanen Immunsystem. Die Untersuchungen haben klinische Relevanz im Hinblick auf die Entwicklung zelltherapeutischer Ansätze zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen bzw. Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Medien, Puffer und Seren

AB-Serum, human, gepoolt:

PAN Biotech (Aidenbach)

Adhärenzmedium:

RPMI ohne Phenolrot (Biochrom, Berlin),
40 U/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco, Karlsruhe)

Annexin-Puffer (Pharmingen/BD, Heidelberg):

Puffer mit einer hohen Calcium-konzentration; gewährleistet die Bindung von AnnexinV an die Phosphatidylserine auf der Plasmamembran.

10 mM HEPES/NaOH pH 7,4

140 mM NaCl

2,5 mM CaCl₂

BSA (Bovine serum albumin): PAA (Linz, Österreich)

Diluent C (Sigma, Steinheim):

Wässrige, osmolaritätsregulierende Lösung, die weder Ca²⁺ noch andere physiologische Salze enthält. Puffer für die Beladung von Zellen mit dem Membranfarbstoff PKH26. Die genaue Zusammensetzung des Puffers gibt der Hersteller nicht bekannt.

DYNAL-Puffer:

PBS

2% Fötale Kälberserum (Gibco, Karlsruhe)

Einfriermedium:

90% Fötale Kälberserum (Gibco, Karlsruhe)

10% Dimethylsulfoxid (Sigma, Steinheim)

FACSflow:

Trägerflüssigkeit für das Durchflusszytometer (BD, Heidelberg)

FACSRinse:

Reinigungsflüssigkeit für das Durchflusszytometer (BD, Heidelberg)

FACS-Waschpuffer (zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen):

PBS

0,6 mg/ml Sandoglobulin (Novartis, Nürnberg)

FCS (Fötale Kälberserum): Gibco (Karlsruhe)

FCS-haltiges Medium:

Standardmedium

10% FCS

Hanks' balanced salt solution (1x):

ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , (PAA Linz, Österreich);

Lymphozytenseparationslösung (Ficoll):

wässrige Lösung pH 7,0 - 7,5

280-340 mOsmol/kg

(PAA, Linz, Österreich)

MACS-Puffer:

PBS

2 mM EDTA (Sigma, Steinheim)

0,5% BSA (PAA Linz, Österreich)

Paraformaldehyd Fixierlösung:

PBS

5 g Paraformaldehyd gelöst; pH=7;

PBS (Phosphate buffered saline): Biochrom (Berlin)

9,5 mM PO_4^{2-} ; ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

Saponinlösung:

PBS

0,1% Saponin (Sigma, Steinheim)

0,1% BSA

Standardmedium (serumfrei):

insgesamt 500 ml RPMI mit Phenolrot (Biochrom, Berlin) mit folgenden Zusätzen:
 200 mmol/l L-Glutamin, 2 ml Vitamine (100 x) (PAA Linz, Österreich), 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (100 x) (PAN Biotech, Aidenbach), 100 mmol/l Natriumpyruvat (PAN Biotech, Aidenbach), 40 U/ml Penicillin (Gibco, Karlsruhe), 40 µg/ml Streptomycin (Gibco, Karlsruhe), 50 µmol/l β-Mercaptoethanol (Gibco, Karlsruhe).

T-Zell-Medium:

Standardmedium

10% vereinigt, humanes AB-Serum

T-Zell-Stimulationsmedium:

T-Zell-Medium + TCGF

+ 3% TCGF (isoliert aus Zellüberstand)

X-Vivo15-Medium: BioWhittaker (Verviers, Belgien)**3.1.2 Antikörper**

Für den Nachweis von Oberflächenmarkern oder intrazellulären Markern wurden folgende monoklonale Antikörper, die direkt mit Fluorochromen konjugiert sind, verwendet:

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugation	Hersteller
CD1a	IgG1	HI149	Maus	PE	Pharmingen (San Diego, USA)
CD3	IgG1	SK7	Maus	FITC	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD3	IgG1	SK7	Maus	PE	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD3	IgG1	SK7	Maus	PerCP	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD3	IgG1	UCHT1	Maus	PC-5	Pharmingen (San Diego, USA)
CD3	IgG1	UCHT1	Maus	APC	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD4	IgG1	SK3	Maus	FITC	Dianova (Hamburg)
CD4	IgG1	SK3	Maus	PE	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD4	IgG1	SK3	Maus	PerCP	Becton Dickinson (Heidelberg)

CD4	IgG1	13B8.2	Maus	APC	Coulter (Krefeld)
CD8	IgG1	SK1	Maus	FITC	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD8	IgG1	SK1	Maus	PE	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD8	IgG1	SK1	Maus	PerCP	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD8	IgG1	RPA-T8	Maus	APC	Pharmingen (San Diego, USA)
CD11a	IgG1	HI111	Maus	PE	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD11b	IgG1	44FITC	Maus	FITC	Cymbus (über Chemicon, Hofheim)
CD11c	IgG1	3.9	Maus	FITC	Cymbus (über Chemicon, Hofheim)
CD14	IgG2b	MOP9.89	Maus	PE	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD20	IgG2a	B9E9	Maus	FITC	Immunotech (Krefeld)
CD20	IgG1	L29	Maus	PE	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD25	IgG1	M-A251	Maus	PE	Pharmingen (San Diego, USA)
CD40	IgM	14G7	Maus	FITC	Monosan
CD45 RA	IgG1	L48	Maus	FITC	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD45RO	IgG2a	UCHL-1	Maus	PE	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD54	IgG1	15.2	Maus	FITC	Cymbus (über Chemicon, Hofheim)
CD56	IgG2b	NCAM16.2	Maus	PE	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD58	IgG2a	BRIC5	Maus	FITC	Dianova (Hamburg)
CD80	IgM	BB1	Maus	FITC	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD83	IgG2b	HB15a	Maus	PE	Immunotech (Krefeld)
CD86	IgG1	FUN-1	Maus	FITC	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD95 (Fas)	IgG1	DX2	Maus	FITC	Pharmingen (San Diego, USA)
CD95 (Fas)	IgG1	DX2	Maus	PE	Pharmingen (San Diego, USA)
FasLigand	IgG1	NOK-1	Maus	-	Pharmingen (San Diego, USA)
Granzyme	IgG1	HC2	Maus	PE	Hölzl Diagnostika (Köln)
HLA-A2	IgG2b	BB7.2	Maus	-	Überstand Zelllinie
HLA-A2	IgG2b	BB7.2	Maus	PE	Serotec (Düsseldorf)
HLA-ABC	IgG1	G46-2.6	Maus	FITC	Pharmingen (San Diego, USA)
HLA-DR	IgG2a	L243	Maus	FITC	Becton Dickinson (Heidelberg)
HLA-DQ	IgG2a	TÜ169	Maus	FITC	Pharmingen (San Diego, USA)
Perforin	IgG2b	delt9G9	Maus	PE	Hölzl Diagnostika (Köln)
TCR $\alpha\beta$	IgG2b	BMA031	Maus	PE	Immunotech (Krefeld)
TCR $\alpha\beta$	IgG2b	BMA031	Maus	PC-5	Immunotech (Krefeld)
TCR $\gamma\delta$	IgG1	B1	Maus	FITC	Pharmingen (San Diego, USA)
TCR $\gamma\delta$	IgG1	IMMU510	Maus	PC-5	Immunotech (Krefeld)
TCRV γ 9	IgG1	B3.1	Maus	FITC	Pharmingen (San Diego, USA)
TCRV δ 2	IgG1	B6.1	Maus	PE	Pharmingen (San Diego, USA)
TRAIL	IgG1	RIK-2	Maus	PE	Pharmingen (San Diego, USA)

Für die Kontrollfärbungen wurden folgende Fluoreszenz-konjugierte Isotypen verwendet:

Isotyp	Klon	Herkunft	Fluoreszenz	Hersteller
IgG1	X40	Maus	FITC	Becton Dickinson (Heidelberg)
IgG1	X40	Maus	PE	Becton Dickinson (Heidelberg)
IgG1	X40	Maus	PerCP	Becton Dickinson (Heidelberg)
IgG1	MOPC-31C	Maus	PC-5	Pharmingen (San Diego, USA)
IgG1	679.1MC7	Maus	APC	Beckman Coulter (Krefeld)
IgG2a	G155-178	Maus	FITC	Pharmingen (San Diego, USA)
IgG2a	X39	Maus	PE	Becton Dickinson (Heidelberg)
IgG2b	MPC-11	Maus	PE	Becton Dickinson (Heidelberg)
IgM	GC323	Maus	FITC	Immunotech (Krefeld)

Folgende polyklonale Sekundärantikörper wurden zum Nachweis von Primärantikörpern eingesetzt:

Spezifität	Fluoreszenz	Herkunft	Hersteller
Mouse IgG +IgM	FITC	Ziege	Dianova (Hamburg)
Mouse IgG +IgM	PE	Ziege	Dako (Glostrup, Dänemark)

Reagentien zur enzymatischen Verstärkung (EAS) von Antikörperfärbungen (Flow^{Amp}, FlowAmp Systems Cleveland, Ohio):

Reagens	Zusammensetzung/ Bezugsquelle
Verstärkungspuffer	Caltag, Hamburg
Färbepuffer	PBS versetzt mit 5% bzw. 2% FCS
Sekundärreagens	anti-Maus-Ig Antikörper-HRP (horseradish peroxidase)
Verstärkungsreagens	Caltag, Hamburg
Nachweisreagens	Streptavidin- FITC

Folgende Antikörper wurden für die Beschichtung der Dynal-Beads verwendet:

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugation	Hersteller
CD56	IgG1	My31	Maus	-	Becton Dickinson (Heidelberg)
CD61	IgG1	VI-PL2	Maus	-	Pharmingen (San Diego, USA)
Glycophorin A	IgG2b	HIR2	Maus	-	Pharmingen (San Diego, USA)

3.1.3 Blockadeagentien

Zur Inhibition von Signalwegen bzw. zur Neutralisierung von Oberflächenmarkern kamen folgende Inhibitoren zum Einsatz:

Blockade-Agentien	Hersteller
CMA (Concanamycin-A): Verhindert die Azidifizierung von Vesikeln; durch einen pH-Wert Anstieg in lytischen Vesikeln beschleunigter Abbau von Perforin; Inhibitor der Type H ⁺ ATPase;	Sigma (Steinheim)
Z-DEVD-FMK (Caspase-3 Inhibitor)	Becton Dickinson (Heidelberg)
neutralisierender anti-Fas-Antikörper (Klon ZH-4)	Upstate (über Biomol, Hamburg)
neutralisierender anti-MHC I-Antikörper (Klon W6/32)	Überstand Zelllinie

3.1.4 Farbstoffe und Färbeagentien

Farbstoff	Konjugation	Hersteller
AnnexinV	FITC	Pharmingen (San Diego, USA)
AnnexinV	PE	Pharmingen (San Diego, USA)
PKH26	-	Sigma (Steinheim)
Propidiumiodid	-	Calbiochem (Läufelfingen, Schweiz)

3.1.5 HLA-A2-bindende Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz	Lösung	Hersteller
Melan-A	ELAGIGILTV	Standardmedium 20% DMSO	Calbiochem (Läufelfingen, Schweiz)
EBV	GLCTLVAML	Standardmedium 10% DMSO	Calbiochem (Läufelfingen, Schweiz)
gp100	ITDQVPFSV	Standardmedium 5% DMSO	Bachem (Heidelberg)
CMV	NLVPMVATV	Standardmedium 10% DMSO	Johns Hopkins University; Baltimore, USA

3.1.6 Peptid-MHC-Tetramere

Tetramer	Konjugation	Hersteller
Melan-A	PE	Beckman Coulter (Krefeld)
CMV	PE	Beckman Coulter (Krefeld)
Tyrosinase	PE	Beckman Coulter (Krefeld)

3.1.7 Zytokine

Zytokin	Hersteller
IL-2 (Proleukin)	Chiron B.V. (Amsterdam, Niederlande)
IL-4	Promocell (Heidelberg)
IL-15	Promocell (Heidelberg)
TGF- β	PeproTech (Rocky Hill, USA)
TNF- α	CellGenix (Freiburg)
PGE-2	Pharmacia & Upjohn (Erlangen)
IL-1 β	Promocell (Heidelberg)
IL-6	Promocell (Heidelberg)
GM-CSF (Leukomax)	Novartis (Nürnberg)

3.1.8 Beads

CD4 ⁺ T cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach)
CD8 ⁺ T cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach)
TCR $\gamma\delta$ T cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach)
Quanti ^{brite} Kit	Becton Dickinson (Heidelberg)
anti-PE Beads	Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach)
M-450 CD4 Dyna-Beads	Dynal (Hamburg)
M-450 CD8 Dyna-Beads	Dynal (Hamburg)
M-450 CD19 Dyna-Beads	Dynal (Hamburg)
M-450 CD14 Dyna-Beads	Dynal (Hamburg)
M-450 anti-Maus IgG Dyna-Beads	Dynal (Hamburg)

3.1.9 Zellkulturflaschen, -platten, -röhrchen

25 cm ² Kulturflaschen	Corning/Costar (NY, USA)
75 cm ² Kulturflaschen	Corning/Costar (NY, USA)
162 cm ² Kulturflaschen	Corning/Costar (NY, USA)
96-well Rundbodenplatten	Falcon/BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
96-well Spitzbodenplatten	Corning/Costar (NY, USA)
24-well Platten	Corning/Costar (NY, USA)
Transwellplatten + Inserts (0,4 μ m Porengröße; Zellkultur-getestet)	Corning/Costar (NY, USA)
12-well Platten	Corning/Costar (NY, USA)
6-well Platten	Corning/Costar (NY, USA)
15 ml Zentrifugationsröhrchen	Corning (NY, USA)
50 ml Zentrifugationsröhrchen	Corning (NY, USA)
200 ml Zentrifugationsröhrchen	Falcon/BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
14 ml Polysytrene Röhrchen	Falcon/BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Facs-Röhrchen unsteril	Falcon/BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Facs-Röhrchen steril	Falcon/BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Einfrier-Röhrchen	Greiner (Frickenhäusen)
1,5 ml Cups	Sarstedt (Nürnberg)
2 ml Pipetten	Corning/Costar (NY, USA)
5 ml Pipetten	Corning/Costar (NY, USA)
10 ml Pipetten	Corning/Costar (NY, USA)
25 ml Pipetten	Corning/Costar (NY, USA)
50 ml Pipetten	Corning/Costar (NY, USA)

3.1.10 Blutproben

3.1.10.1 Gesunde Spender

Von gesunden Blutspendern wurde 20 - 100 ml heparinisiertes Vollblut gewonnen und daraus mononukleäre Zellen (MNC) über Ficoll-Separation isoliert. Dieses Zellmaterial wurde vorwiegend für die autologen Versuchsansätze, die spezifischen T-Zell-Kulturen und die Phänotypisierung von DN T-Zellen verwendet. Weitere gesunde Spenderzellen wurden aus Leukapheresaten (Leukozytenspende) (allogene Versuche von Abschnitt 4.1.5.2, S. 66) oder aus buffy coats, die vom Bayerischen Roten Kreuz bezogen wurden (allogene Versuche von Abschnitt 4.1.5.1, S. 65), gewonnen. Die Blutspender wurden über die Verwendung der Zellen zu Forschungszwecken aufgeklärt und erklärten sich damit einverstanden. Ein positives Ethikvotum liegt vor. Das Durchschnittsalter der gesunden Spender beträgt 32 Jahre.

3.1.10.2 Patienten mit Autoimmunerkrankungen

Den Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen wurde 7,5 ml heparinisiertes Vollblut entnommen. Aus dem Vollblut wurden die mononukleären Zellen mittels Ficoll-Aufreinigung isoliert und anschließend mit Antikörpern gefärbt. Dabei wurden die Blutproben am selben Tag aufgearbeitet und weder gelagert noch eingefroren. Es konnten 23 Proben gesammelt werden, wobei das Durchschnittsalter der Patienten bei 43 Jahren liegt. Für die T-Zell-Analysen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen liegt ein positives Ethikvotum vor.

Pat. Nr.	Alter	Probendatum	Erkrankung
AK#324	35	17.01.02	Rheumatoide Arthritis
AF#319	20	14.12.01	Lupus
AS#320	63	19.12.01	Sjögren Syndrom
AK#327	29	22.01.02	Lupus (leichte Erscheinungsf.)
AS#328	62	25.01.02	Rheumatoide Arthritis
AB#331	47	29.01.02	Multiple Sklerose
AG#330	20	29.01.02	Typ-I Diabetes
AS#332	33	29.01.02	Typ-I Diabetes
AB#339	39	07.02.02	Undifferenzierte Kollagenose
AF#340	49	08.02.02	Morbus Crohn
AK#337	37	07.02.02	Sjögren Syndrom
AW#338	72	07.02.02	primär-biliäre Zirrhose (PBZ)
AE#341	50	11.02.02	Rheumatoide Arthritis
AF#366	65	13.03.02	Sjögren Syndrom
AO#451	36	25.07.02	Sjögren Syndrom

AH#415	35	03.09.02	Lupus
AN#416	48	03.09.02	Rheumatoide Arthritis
AK#420	53	03.09.02	Polymyositis
AB#425	39	25.09.03	Sjögren Syndrom
AP#442	43	19.03.03	CVID
AK#443	45	31.03.03	Sjögren Syndrom
AS#444	46	03.04.03	Fibromyalgica rheumatica
AY#445	28	04.04.03	Rheumatoide Arthritis

3.2 Methoden

3.2.1 Kultur von primären Melanomzellen und T2 Zellen

Tumorzelllinien und die T2 Zelllinie werden in FCS-haltigem Medium kultiviert. Die Melanomzelllinien Me275 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. Romero, Ludwig-Institute for Cancer Research, Lausanne, Schweiz), Mel493 und Na8 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. G. Spagnoli, Kantonsspital Basel, Schweiz) wurden aus Melanommetastasen etabliert. Alle 3 - 4 Tage werden die Zellen mit Accutase (PAA, Linz, Österreich) vom Flaschenboden gelöst, mit PBS gewaschen und gesplittet.

3.2.2 Beladung der T2 Zellen

T2 Zellen sind eine humane HLA-A*0201 lymphoide Hybridomzelllinie, die aus einer T- und einer EBV-transformierten B-Zelllinie entstanden ist. T2 Zellen weisen eine Defizienz des TAP-Transporter-Proteins auf, weshalb die HLA-A2-Moleküle auf der Zelloberfläche leere MHC-Bindungsstellen aufweisen. Diese unbesetzten Bindungsstellen lassen sich deshalb effektiv mit exogenen HLA-A2-bindenden Peptiden beladen [190]. T2 Zellen werden zur Entfernung instabiler MHC-Komplexe für 6 h bei Raumtemperatur in X-Vivo15 Medium inkubiert. Dann werden die Zellen in Standardmedium bei einer Zelldichte von $1,5 - 3 \times 10^6/\text{ml}$ mit $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ Peptid und $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ β_2 -Mikroglobulin bei 37°C über Nacht beladen. Für davon abweichende Peptidkonzentrationen und das Titrationsexperiment mit Melan-A-Peptid wurde eine Zelldichte von $1,5 \times 10^6/\text{ml}$ eingehalten. Das Volumen des zugegebenen Melan-A-Peptides betrug für alle Peptidkonzentrationen $100 \mu\text{l}$. Die Zellen werden viermal mit 15 ml serumhaltigem Medium gewaschen und gezählt.

3.2.3 Isolierung von MNC über Dichtegradientenzentrifugation

Das Vollblut wird 1:1 mit PBS verdünnt und auf Lymphozytenseparationslösung überschichtet. Nach 27-minütiger Zentrifugation bei 649 g (4°C) ist das Vollblut aufgetrennt in eine schwere Fraktion (Erythrozyten), eine Interphase (mononukleäre Zellen) und Blutplasma mit Thrombozyten im Überstand. Die Interphase wird mit einer

Transferpipette abgesammelt und bei 583 g (4 °C, 10 min) mit PBS gewaschen. Es folgt ein weiterer Waschschrift mit 345 g (4 °C, 9 min). Die Zellen werden gezählt.

3.2.4 Adhärenzselektion von Monozyten

20 - 80 x 10⁶ MNC werden in RPMI ohne Phenolrot und 10% autologem Serum aufgenommen und in einer Zellkulturflasche (75 cm²) ausplattiert. Während der sich anschließenden Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C adhären die Monozyten auf dem Plastikboden der Kulturflasche. Die nichtadhärente Zellfraktion (periphere Blutlymphozyten, PBL) wird abgeerntet und steht für Weiterverarbeitung und Kryokonservierung zur Verfügung. Die adhärenente Zellfraktion wird 2 - 3 mal kräftig mit PBS gespült und zur Generierung von DC verwendet.

3.2.5 Gegenstromelutriation

Die verwendeten Zellen stammen aus der wöchentlichen Leukapherese (Leukozytenspende) gesunder Spender am Universitätsklinikum Regensburg. Aus den abgesammelten Leukozyten werden durch eine Ficoll-Separation (Beutelsystem) die MNC isoliert. Parallel wird das Schlauchsystem des Elutriators mit H₂O₂ sterilisiert und mit PBS gewaschen. Vor jedem Elutriationslauf wird die Peristaltikpumpe geeicht. Für den Elutriationslauf werden die Zellen in Hanks-Puffer mit 6% autologem Plasma mittels einer Peristaltikpumpe in den Elutriator eingebracht. Durch die beiden entgegengesetzten Kräfte der Peristaltikpumpe und der Zentrifugalkraft der Zentrifuge baut sich ein Gleichgewichts-Zellgradient auf. Durch kontrollierte Erhöhung der Pumpenstärke kommt es sukzessiv je nach der Dichte der Zellen zur Ausgabe von Zellfraktionen. Die Monozyten befinden sich in der letzten Fraktion (III). Der Reinheitsgrad elutrierter Monozyten liegt zwischen 60 und 85%. Die T-Zellen befinden sich in der IIa1/ und IIa2 Fraktion. Pro Elutriationslauf konnten ca. zwischen 400 und 1400 x 10⁶ T-Zellen gewonnen werden.

3.2.6 Generierung von dendritischen Zellen

Für die Generierung dendritischer Zellen (DC) werden entweder elutrierte Monozyten (für allogene Versuchsansätze) oder Monozyten aus einer Adhärenzkultur (autologe Versuchsansätze) verwendet. Dabei werden die Monozyten unter Zugabe der folgenden Zytokine für 5 Tage bei 37 °C inkubiert: 500 U/ml IL-4, 500 U/ml GM-CSF und 5 ng/ml TGF-β1. Als Medium wird für die allogenen Versuchsansätze FCS-haltiges Medium verwendet, für die autologen Ansätze wird Standardmedium mit 2% autologem Serum verwendet. Durch die Verwendung von autologem Serum wird die Aufnahme von Fremdproteinen durch die stark phagozytotisch aktiven, unreifen DC minimiert.

Am Tag 5 werden die unreifen DC für weitere zwei Tage terminal ausdifferenziert mit folgendem Zytokingemisch: 10 ng/ml IL-1β, 1000 U/ml IL-6, 1 µg/ml PGE-2, 10 ng/ml TNF-α, und 250 U/ml IL-4 und 250 U/ml GM-CSF. Die reifen DC werden direkt für die

Versuche verwendet oder in Einfriermedium eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.7 Exogene Beladung von dendritischen Zellen (DC)

DC werden in 15 ml Standardmedium gewaschen und auf eine Zelldichte von $1 - 4 \times 10^6$ Zellen/ml Standardmedium eingestellt. $30 \mu\text{g/ml}$ des jeweiligen Peptids und $10 \mu\text{g/ml}$ β_2 -Microglobulin (ICN, Aurora USA), welches die zu beladenden MHC-Komplexe stabilisiert, wird zugegeben. Diese Zellsuspension wird für 2 - 3 h bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert, um die Adhäsion der DC an das Plastik zu vermeiden. Die beladenen DC werden nach der Inkubationsphase mit 20 ml T-Zell-Medium gewaschen.

3.2.8 pMHC Transferversuche

Zur Untersuchung des pMHC-Transfers werden HLA-A2 negative DN T-Zellen mit HLA-A2⁺ pMHC-Donoren in T-Zell-Medium im Verhältnis von 1:1 in 96-well-Rundbodenplatten koinkubiert. Das Verhältnis von DN T-Zellen zu DC wird in diesem Fall sehr hoch gewählt, da ein Kontakt zwischen beiden Zelltypen sichergestellt werden soll. Die Zellen werden bei 51 g (4°C , 1 min) ohne Bremse anzentrifugiert, damit die Zellen von Versuchsbeginn an zellulären Kontakt eingehen können. Nach verschiedenen Zeitpunkten werden die Zellen abgeerntet.

Die pMHC Transferversuche im Transwellssystem werden in 48-well-Platten durchgeführt. Es werden Inserts mit einer Polycarbonat-Membran verwendet. Die Vertiefungen der Platte werden mit $600 \mu\text{l}$ der DN T-Zell-Suspension befüllt. Anschließend werden die DC in einem Volumen von $100 \mu\text{l}$ in das Insert einpipettiert und langsam in die Vertiefung gesenkt. Luftblasen können durch leichtes Anheben des Inserts entweichen. Zwischen dem Boden der Vertiefung und dem Insert besteht ein Abstand von 1 mm. Für die Versuche im Transwellssystem wird auf das Anzentrifugieren der Zellen verzichtet.

3.2.9 Konditionierungskultur von DN T-Zellen

Für die autologen Funktionstests werden DN T-Zellen für 19 - 21 h mit beladenen bzw. unbeladenen DC im Verhältnis 5:1 in T-Zell-Medium mit 50 U/ml IL-2 und 50 U/ml IL-4 Endkonzentration koinkubiert. Durch den verringerten Einsatz von DC soll die spätere "Kontamination" von konditionierten DN T-Zellen mit DC gering gehalten werden. Die Zellen werden mit 51 g (4°C , 1 min) ohne Bremse anzentrifugiert.

Für die allogenen Versuchsansätze werden $\text{TCR}\gamma\delta^+$ T-Zellen eines unverwandten, dritten Spenders für 2 Tage in Anwesenheit von DC vom "Stimulator-Typ" in T-Zell-Medium mit 50 U/ml IL-2 und 50 U/ml IL-4 konditioniert. Die Zellen werden mit 44 g (4°C , 1 min) ohne Bremse anzentrifugiert.

3.2.10 Generierung von CD8⁺ spezifischen T-Zell-Linien

CD8⁺ T Lymphozyten werden aus MNC durch magnetische Negativselektion nach dem Miltenyi-System angereichert. Die angereicherte Population besteht aus > 90% CD8⁺ T Zellen. Als Stimulatorzellen dienen autologe, monozytengereifte, peptidbeladene DC. Für die Expansionskultur werden jeweils 10⁴ CD8⁺ Zellen/well und 5 x 10³ peptidbeladene, autologe DC/well in 96-well Rundbodenplatten kultiviert. Als Medium wird 225 µl T-Zell-Stimulationsmedium/well verwendet und alle 3 - 4 Tage gewechselt. Die CD8⁺ T-Zellen werden wöchentlich mit Peptid-beladenen, autologen DC mit den gleichen Stimulationsbedingungen restimuliert.

3.2.11 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen werden gezählt, in 15 ml PBS gewaschen und in 1,6 ml gekühltem Einfriermedium aufgenommen. Anschließend wird die Zellsuspension in gekühlte Einfrier Röhrchen abgefüllt, wobei eine Zellzahl von 100 x 10⁶ Zellen/Einfrier-Röhrchen nicht überschritten werden soll. Der Abfüllvorgang wird auf Eis ausgeführt, sofern mehr als 10 Einfrier-Röhrchen zu befüllen sind. Die befüllten Einfrier-Röhrchen werden in eine 4 °C kühle Einfrierbox (Nalgene Nunc, International Hereford, U.K.) gestellt und für einige Tage bei -80 °C gelagert. Die mit Isopropanol gefüllten Einfrierboxen gewährleisten ein definiertes Abkühlen der Zellen um -1 °C/ml pro min. Danach werden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.12 Auftauen von Zellen

Die tiefgekühlten Zellen werden im 37 °C Wasserbad auf 0 °C erwärmt. Danach wird den Zellen sukzessive im Minutenabstand eine definierte Menge serumhaltiges Medium (je nach Zellart T-Zell-Medium oder FCS-haltiges Medium, Raumtemperatur) zugeführt. Dieses Protokoll gewährleistet ein zügiges und schonendes Auftauen der Zellen. Im Anschluss daran werden die Zellen sofort abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen.

Zeitpunkt	0 min	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min	6 min	7 min	8 min	9 min
zugegebene Menge Medium (in ml)/pro ml Einfriermedium	0,1	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75

3.2.13 Antikörperfärbungen

3.2.13.1 Direkte Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen

Pro Röhrchen werden 0,5 bis 1,0 Mio Zellen zweimal mit 1 ml FACS-Waschpuffer gewaschen. Der Überstand wird jeweils verworfen. Die angegebene Menge Antikörper wird auf das Zellpellet pipettiert und 13 min bei 4 °C inkubiert. Danach folgt ein

Waschschritt mit PBS. Die Zentrifugationsschritte werden bei 460 g (4 °C, 5 min) durchgeführt.

3.2.13.2 Indirekte Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen

Für indirekte Antikörperfärbungen wird nach obiger Beschreibung mit dem Primärantikörper gefärbt. Danach wird ein Sekundärantikörper gegen den Isotyp des Primärantikörpers in einer vom Hersteller angegebenen Konzentration in gleicher Weise eingesetzt.

3.2.13.3 Enzymatisch verstärkte Antikörperfärbung

Durch die enzymtische Verstärkung der Antikörperfärbung (Flow^{Amp}, FlowAmp Systems Cleveland, Ohio) kann eine 10- bis 100-fache Signalverstärkung erreicht werden. Dabei wird nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Arbeitsschritt	Medium
Waschen	PBS
Waschen	Färbepuffer 5%
Inkubation 10 min RT	Primärer Antikörper in 50µl Färbepuffer 5%
2 x Waschen	Färbepuffer 5%
Inkubation 10 min RT	50 µl Sekundärreagens 1 : 100 in Färbepuffer 2%
3 x Waschen	Färbepuffer 2%
Waschen	PBS
Inkubation 10 min RT	50 µl Verstärkungs-Reagens 1 : 20 in Verstärkungspuffer
2 x Waschen	Färbepuffer 2%
Inkubation 10 min RT dunkel	50 µl Nachweis-Reagens 1 : 100 in Färbepuffer 2%
2 x Waschen	Färbepuffer 2%
Zellen suspendieren	PBS

Alle Zentrifugationsschritte werden bei 460 g (4 °C, 6 min) ausgeführt. Der Überstand wird abgesaugt statt abgekippt, um den Zellverlust möglichst gering zu halten.

3.2.13.4 Intrazellulärfärbung

Für die durchflusszytometrische Detektion von Molekülen im Zellinneren werden die Zellen nach folgendem Protokoll vorbereitet:

Arbeitsschritt	Medium
Oberflächen Antikörperfärbung	Antikörper in adäquater Menge
Fixierung 9 - 10 min RT	0,25% PFA
Waschen	PBS
Waschen	Saponinlösung

Intrazellulärfärbung 30 min auf Eis	100 µl Saponinlösung; 10 µl Antikörper
Waschen	Saponinlösung
Waschen	Saponinlösung
Waschen	PBS
Fixieren	2% PFA
Messen der Zellen	PBS

Zentrifugationsschritte werden jeweils bei 460 g (4 °C, 5 min) ausgeführt.

3.2.14 pMHC-Tetramerfärbung

Zum Nachweis spezifischer T-Zellen werden die Zellen einmal mit FACS-Waschpuffer gewaschen und danach mit der angegebenen Menge des jeweiligen pMHC-Tetramers inkubiert. Im Anschluss daran wird die Oberflächenfärbung gegen weitere Antigene mit direkt-konjugierten Antikörpern durchgeführt, ohne das pMHC-Tetramer vorher abzuwaschen. Nach der Inkubationszeit der Antikörperfärbung werden die Zellen mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Für die Versuche, in denen die pMHC-Tetramerfärbung vor dem Apoptose-Test ausgeführt wird, wird steriler FACS-Waschpuffer ohne PFA verwendet. Die Färbebedingungen für die pMHC-Tetramere sind wie folgt:

Tetramer	Verdünnung/ Menge	Inkubation
Melan-A	1 : 15/ 15 µl	30 min 37° C
CMV	1 : 10/ 5µl	30 min 37° C

3.2.15 Generierung von PHA-Blasten

4×10^7 MNC werden in einer Dichte von 2 Mio/ml in T-Zell-Medium aufgenommen und mit 1 µg PHA-P/ml (Sigma, Steinheim) versetzt. Nach 4 Tagen werden die Zellen gezählt. Es sollten etliche Zellen abgestorben sein. Man setzt die Zellen nun in T-Zell-Stimulations-Medium mit 50 U/ml IL-2 um. Alle 3 - 4 Tage werden die Zellen geerntet, gezählt und in frisches Medium umgesetzt. Die Zellen proliferieren stark und wachsen in Clustern. Die PHA-Blasten können in Portionen von 5 - 10×10^6 kryokonserviert werden. PHA-Blasten sind stark aktivierte, expandierte T-Zellen und werden generiert, um eine große Anzahl von Zellen eines bestimmten Individuums für Funktionsanalysen zur Verfügung zu haben.

3.2.16 Magnetische Zellseparation

Diese Zell-Anreicherungs-methode beruht auf der Bindung von Antikörper-beschichteten Eisenpartikeln („Beads“) an Zellen. Das Prinzip beruht auf zwei Schritten: Im ersten Schritt werden die Eisenpartikel an die Zellen gebunden. Im zweiten Schritt wird die Zellsuspension an einem Magneten vorbeigeführt und separiert. Dabei gibt es positive

Anreicherungsverfahren, in welchen die Beads an die gewünschte Subpopulation gebunden werden, und negative Anreicherungsverfahren, in denen die zu depletierenden Zellpopulationen mit Beads markiert werden. In dieser Arbeit kamen die Zellseparationssysteme von zwei verschiedenen Herstellern zum Einsatz:

3.2.16.1 Anreicherung von Zellen nach der Miltenyi-Methode

Hierfür werden die Zellen in einem Zwei-Schritt-Färbeverfahren gefärbt. Im ersten Färbeschritt wird der mit MACS-Puffer verdünnte Hapten-Antikörper (mAK Maus anti-X) eingesetzt, im zweiten Färbeschritt der ebenfalls mit MACS-Puffer verdünnte anti-Hapten-Antikörper (mAK Beads anti-Maus-Isotyp). Die verwendeten Mengen Antikörper, MACS-Puffer, sowie die Inkubationszeiten sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Lediglich bei der Isolation von PE⁺ Zellen wird ein PE-Antikörper nach eigener Wahl eingesetzt, der Zweitantikörper hat seine Spezifität gegen den PE-Farbstoff gerichtet.

Da die verwendeten Beads lediglich einen Durchmesser von 50 nm („Microbeads“) aufweisen, muss die Zellsuspension über eine Säule laufen, welche dicht mit Eisenpartikeln gepackt ist. Für sämtliche Aufreinigungsläufe werden LS⁺-Einmal-Säulen (Fa. Miltenyi, Bergisch-Gladbach) verwendet, die in einen Permanentmagneten eingespannt werden. Vor dem Säulenlauf wird die Säule mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Im Folgenden wird die Zellsuspension in entsprechendem Volumen auf die Säule aufgebracht.

Die Separationsstrategie ist bei der Selektion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eine Negativselektion, d.h. es adhären alle Zellen an der Säule, die nicht den gewünschten Phänotyp besitzen. Die restlichen, ungefärbten Zellen werden in der Negativfraktion aufgefangen. Die TCRγδ⁺ und PE⁺ Zellen werden mit einer Positiv-Anreicherungsstrategie isoliert, d.h. die gewünschten Zellen befinden sich nach dem Säulenlauf in der Säule und müssen als Positivfraktion mit 5 ml MACS-Puffer unter Druck eluiert werden.

		Selektion von CD4 ⁺	Selektion von CD8 ⁺	Isolation von PE ⁺ Zellen	Isolation von TCRγδ ⁺ DN- T-Zellen
Depletion von Zellpopulationen		CD8 ⁺ , CD11b ⁺ , CD16 ⁺ , CD19 ⁺ , CD20 ⁺ , CD56 ⁺	CD4 ⁺ , CD11b ⁺ , CD16 ⁺ CD19 ⁺ , CD20 ⁺ , CD56 ⁺		
1. Färbeschritt	MACS-Puffer	80 µl/10 ⁷	80 µl/10 ⁷	-	40 µl/10 ⁷
	1. Antikörper	20 µl/10 ⁷	20 µl/10 ⁷	lt. Hersteller	10 µl/10 ⁷
Inkubation (4 °C)		10 min	10 min	15 min	10 min
Waschen	MACS-Puffer	20 x Vol.	20 x Vol.	20ml	-

Waschen	MACS-Puffer	20 x Vol.	20 x Vol.	20ml	-
2. Färbeschritt	MACS-Puffer	80 µl/10 ⁷	80 µl/10 ⁷	80 µl/10 ⁷	30 µl/10 ⁷
	2. Antikörper	20 µl/10 ⁷	20 µl/10 ⁷	20 µl/10 ⁷	20 µl/10 ⁷
Inkubation (4 °C)		15 min	15 min	15 min	15 min
Waschen	MACS-Puffer	20 x Vol.	20 x Vol.	20 x Vol.	20 x Vol.
Säule (Waschen)	MACS-Puffer	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Applikationsvol.	MACS-Puffer	500 µl	500 µl	5 ml	5 ml
Eluieren	MACS-Puffer	4 x 3ml	4 x 3ml	3 x 3ml	3 x 3ml
Separations- strategie		Negativsel.	Negativsel.	Positivsel.	Positivsel.

Anmerkung: Angaben gelten für mittlere Säulen (LS⁺, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach)

Die Beads, die für die Postivanreicherung von TCRγδ⁺ DN T-Zellen verwendet wurden, waren FITC-konjugiert.

3.2.16.2 Voraufreinigung der Zellen nach der Dynal-Methode

Bei dieser magnetischen Aufreinigungsmethode werden Beads mit einer Größe von 4,5 µm verwendet. Da diese Beads einen größeren Durchmesser als Miltenyi-Beads haben, reicht für den Separationsschritt ein Handmagnet. Diese Zellseparationsmethode wird als Voraufreinigung für die Fluoreszenzsortierung von DN T-Zellen eingesetzt. Dabei können DN T-Zellen bis zu einer Reinheit von 20% voraufgereinigt werden. Direkt-konjugierte Beads gegen CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ und CD14⁺ werden von der Fa. Dynal bezogen. Nach zweimaligem Waschen mit Dynal-Puffer im Magneten werden die Beads in den angegebenen Mengen zur Markierung verwendet.

Spezifität der Beads	depletierte Zellpopulation	Menge an Beads/ 50x10 ⁶ Zellen
CD4	Helfer-T-Zellen	410 µl
CD8	Killer-T-Zellen	330 µl
CD19	B-Zellen	150 µl
CD14	Monozyten	50 µl

Für die Depletion der restlichen Zellpopulationen werden die Beads vor jeder Separation selbst hergestellt. Hierfür werden anti-IgG-Beads mit Primärantikörpern der gewünschten Spezifität inkubiert. Die Beads wurden mit den in der folgenden Tabelle angegebenen Mengen an Antikörpern für ca. 45 min bei RT unter Schütteln inkubiert, danach zweimal mit Dynal-Puffer im Magneten gewaschen.

Antigen	depletierte Zellpopulation	Primärantikörper	anti-IgG Dynal-Beads
CD56	NK-Zellen	40 µl/ 10 ⁷ Zellen	75µl/ 10 ⁷ Zellen
CD61	Blutplättchen	20 µl	500 µl
Glycophorin-A	Erythrozyten	20 µl	500 µl

Die Zellen werden mit den Beads für 50 min bei RT in einem Volumen von 3 ml Dynalpuffer/50 Mio Zellen unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die anschließende Zellseparation im Magneten wird zweimal mit einer Dauer von 3 min durchgeführt. Der Überstand wird für die fluoreszente Zellsortierung weiter verwendet.

3.2.17 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS) dient der Detektion von Zell-gebundenen Farbstoffen und liefert phänotypische Aussagen über die gefärbten Zellen. Dabei werden die Zellen in einer Trägerflüssigkeit an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Im verwendeten Gerät (FACSCalibur, BD, Heidelberg) standen zwei Laser (Argon- und UV-Laser) für die Anregung der Farbstoffe zur Verfügung. Die Emission der Farbstoffe wird in vier Kanälen gemessen. Außerdem wird die Lichtstreuung jeder Zelle detektiert: Das sog. "Vorwärts-Streulicht" liefert Information über die Größe der Zellen, das sog. "Seitwärts-Streulicht" vermittelt Information über die Granularität der Zelle. Zusammengenommen werden damit für jede Zelle sechs Parameter ermittelt. Als Farbstoffkonjugate werden FITC (Fluorothioisocyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridin-Chlorophyll-Protein), PC-5 (Phycoerythrin-Cyanin-5) und APC (Allophycocyanin) verwendet. Außerdem können im Durchflusszytometer Membranfarbstoffe detektiert werden.

3.2.18 Fluoreszente Zellsortierung

Die fluoreszente Zellsortierung ist eine Spezialanwendung der Durchflusszytometrie und wird mit Hilfe des FACSSStar Plus (Becton Dickinson, Heidelberg) am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt. Die gemessenen, phänotypisch charakterisierten Zellen werden dabei in ein Ausgabegefäß (bzw. für die Klonierung von DN T-Zellen in 96-well Platten) einsortiert.

Hierbei wird das Gerät samt Schläuchen vor jedem Sortiervorgang für 20 - 30 min mit 70% Ethanol sterilisiert, anschließend 30 min mit PBS gespült. Der Zellsortierer muss anschließend mit fluoreszierenden Partikeln (yellow/green-Beads; Fa. Polysciences, Warrington, PA) kalibriert werden. Dabei wird die Einstellung der Spiegel im Gerät, das Auftreffen des Laserpunktes und die Form des Laserpunktes adjustiert. Für die Zellsortierung haben sich folgende Einstellungen als optimal erwiesen: Abstand zwischen Abrisspunkt und Laserpunkt: 0,175 Zoll; Drop delay: 12, 5; Sweep trigger: 23048. Mit Hilfe von fluoreszierenden Beads wird im Fluoreszenzmikroskop überprüft, ob die gewählte

Anzahl von Partikeln pro Tropfen tatsächlich ausgegeben wird. Die Frequenz gemessener Zellen liegt bei durchschnittlich 2500 Zellen/s.

3.2.19 Klonierung von DN T-Zellen

Zur Klonierung von DN T-Zellen werden folgende Feeder-Zellen verwendet: 5 Mio allogene MNC (mit 30 Gy bestrahlt) und 1 Mio Laz388 Zellen (mit 100 Gy bestrahlt) pro 96-well Platte. Laz388 ist eine immortalisierte EBV-transformierte B-Zell-Linie. Die Zellen werden ausplattiert in 150 µl T-Zell-Stimulationsmedium. Um einen engen Zell-Zell-Kontakt zu gewährleisten, werden Spitzbodenplatten verwendet. Die DN T-Zellen werden am Fluoreszenzsorter mit einer bis drei Zellen/well eingesät. Alle vier Tage wird ein Medienwechsel durchgeführt. Wenn ab Tag 10 die Klone auswachsen, werden die positiven wells abgeerntet und auf eine Reihe 96-well Rundbodenplatten aufgeteilt. Ab dem Tag des Aberntens werden die Klone in 96-well Rundbodenplatten gehalten und einmal wöchentlich mit Feederzellen restimuliert. Alle vier Tage wird ein Medienwechsel durchgeführt. So werden die DN T-Zell-Klone expandiert und zu 2 bis 4 Mio/ Einfrier-
röhrchen eingefroren.

3.2.20 Cytokine-Bead-Array (CBA)

Durchflusszytometrische Quantifizierung der Zytokine im Überstand (BD, Heidelberg): Es werden sechs verschiedene Typen von Beads verwendet, welche durch ihre unterschiedliche Fluoreszenzintensität in Kanal 3 identifiziert werden können. Durch eine Beschichtung der Beads mit anti-Zytokin-Antikörpern werden die freien Zytokine im Überstand gebunden. Im nächsten Schritt werden die Detektionsantikörper, die PE-konjugiert sind, zugeben. Sie binden an die Zytokine und machen diese dadurch im Durchflusszytometer detektierbar. Die Menge eines gebundenen Zytokins korreliert mit der Fluoreszenzintensität für PE.

3.2.21 Mixed lymphocyte reaction (MLR)

Frische Responder-MNC nach Ficoll werden im Verhältnis 1,5 : 1 mit allogenen Stimulator-MNC gemischt in T-Zell-Medium mit 100 µl/well ausplattiert. Die Stimulator-MNC werden, um deren eigenes Wachstum zu verhindern, zuvor mit 30 Gy bestrahlt. In weiteren 100 µl T-Zell-Medium werden die Suppressorzellen zugegeben. Das Verhältnis von Suppressor- zu Responderzellen ist in den jeweiligen Abbildungen dieser Arbeit angegeben. Die Zellen werden für fünf Tage inkubiert. Am Vortag des Test-Endes wird ³H-Thymidin steril zugegeben. Die ³H-Thymidin-Stammlösung wird 1 : 10 verdünnt mit T-Zell-Medium und 10 µl/ well (= 1 µCi) eingesetzt. Nach 18 - 20 h wird die Platte mittels eines Absauggerätes auf eine Filterplatte (UniFilter, Packard, Niederlande) abgeerntet. Nach dem Trocknen der Platte wird die Filterplatte auf dem Boden mit einer Klebefolie (Packard, Niederlande) abgedichtet und mit 50 µl/well Szintillationsflüssigkeit (Mikroscint-20, Packard, Niederlande) pro well betropft. Die Platte wird mit einer

Klebefolie auf der Oberseite versiegelt (TopSeal, Packard, Niederlande). Im Szintillationszähler (TopCount, Fa. Packard, Niederlande) wird die Radioaktivität der Einzelwells in "Ereignissen pro Minute" (cpm) ermittelt.

3.2.22 ⁵¹Cr-Freisetzungstest

Die Effektorzellen wurden in den angegebenen Effektor : Target Verhältnissen in T-Zell-Medium ausplattiert. Die Zielzellen werden für 1 h mit 200 µCi ⁵¹Cr markiert, zweimal gewaschen und in den mit 2000 Zielzellen/well auf Spitzbodenplatten in T-Zell-Medium ausgesät. Für die Ermittlung der Spontanfreisetzung wurden Zielzellen in T-Zell-Medium ohne Effektorzellen ausplattiert. Die Maximalfreisetzung wurde ermittelt, indem 100 µl Zielzellen in 100 µl/well Triton X-100 (Sigma, Steinheim) kultiviert wurden. Die Zytotoxizität wurde mindestens in Dreifach-Ansätzen nach folgender Formel ermittelt:

$$\frac{(\text{cpm Probe} - \text{cpm Spontanfreisetzung})}{(\text{cpm Maximalfreisetzung} - \text{cpm Spontanfreisetzung})} \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse}$$

3.2.23 PKH26 Apoptose-Test

Die Beladung der Zielzellen erfolgt in 14 ml Polystyrene-Röhrchen. Es wird jeweils eine konstante Zellzahl für die Färbung eingesetzt (siehe folgende Tabelle). Die Zellen werden zunächst einmal in Standardmedium gewaschen und aufgenommen in Diluent C. Die Färbelösung wird jeweils frisch vor der Beladung hergestellt: PKH26 Farbstoff wird in der angegebenen Menge Diluent C verdünnt und auf dem Vortex-Mischer vermischt. Die Menge des eingesetzten PKH26 Farbstoffes sowie die verwendete Zellzahl werden der Größe der verwendeten Zellen angepasst. Im Beladungsschritt wird die Färbelösung tropfenweise unter Schütteln der Zellsuspension zugegeben. Anschließend werden die Zellen 40 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

	Tumorzellen	CTL	PHA-Blasten
Zellzahl	2,0 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶
Diluent C für Zellsuspension	200 µl	200 µl	200 µl
Diluent C für Färbelösung	200 µl	200 µl	200 µl
PKH26 Farbstoff	0,8 µl	0,5 µl	0,5 µl
Inkubationsdauer	40 min	40 min	40 min

Die Beladung wird mit 2 ml humanem AB-Serum für 3 min abgestoppt. Die Serumproteine binden freie Farbstoffreste. Danach wird mit serumhaltigem Medium (je nach Zellart T-Zell-Medium oder FCS-haltiges Medium) aufgefüllt und die Zellen

abzentrifugiert. Es folgen zwei Waschschrte in 40 ml serumhaltigem Medium. Danach wird die Zellzahl der PKH26⁺ Zielzellen ermittelt.

Parallel zur Beladung der Zielzellen werden die Effektorzellen in den gewünschten Effektor- : Target -Verhältnissen in einem Volumen von 100 µl/well in Spitzbodenplatten ausplattiert. Die Zielzellen (konstant 5000 Zielzellen/well) werden zum Schluss in einem Volumen von 100 µl T-Zell-Medium dazupipettiert. Die Zugabe der Zielzellen legt den Startzeitpunkt des Tests fest. Der Test wird für 4 h bei 37 °C inkubiert.

Danach werden die Zellen (je 1 Ansatz/Röhrchen) aus den wells abgeerntet und in PBS gewaschen. Die Zellen werden dann in 100 µl Annexin-Puffer aufgenommen und mit 5 µl AnnexinV-FITC für 10 min bei Dunkelheit gefärbt.

Da AnnexinV-FITC erfahrungsgemäß die Hintergrundfärbung erhöht, d.h. die Negativpopulation leicht in den positiven Bereich verlagert, ist es notwendig, die Kompensation des Durchflusszytometers in Anwesenheit von AnnexinV auszuführen. Für die Kompensation werden folgende Röhrchen präpariert: a. Annexin⁺PKH26⁻ Zielzellen; b. Annexin⁺PKH26⁺ Zielzellen. Bewährte Geräteeinstellungen werden für den jeweiligen Apoptose-Test wiederverwendet.

3.2.24 Autologer Apoptose-Test

Dieser Apoptose-Test wird verwendet, um die Lyse von CD8⁺ Antigen-spezifischen T-Zellen durch DN T-Zellen nachzuweisen. Die DN T-Zellen (Suppressorzellen) werden in ansteigenden Suppressor : CTL Verhältnissen in einem Volumen von 100 µl in Rundbodenplatten ausplattiert. Dabei werden entweder sortierte DN T-Zellen oder DN T-Zell-Klone verwendet. Wenn TCRγδ⁺ DN T-Zellen als Suppressorzellen verwendet werden, wird eine anti-TCRγδ-PC-5 Färbung durchgeführt. Für TCRαβ⁺ DN T-Zellen wird diese Färbung weggelassen.

Zuletzt werden die CD8⁺ CTL (Zielzellen) mit 5000 CTL/well in 100 µl/well dazupipettiert. Für den gesamten Test wird T-Zell-Medium verwendet. Um einen optimalen Zell-Zell-Kontakt zu gewährleisten, werden die Platten für 1 min bei 51 g (4 °C, 1 min, ohne Bremse) anzentrifugiert. Die Inkubationsdauer beträgt 4 h bei 37 °C.

Nach 4 h werden die Überstände für die Zytokinmessung abgenommen und die jeweiligen wells eines Ansatzes in einem Röhrchen vereinigt. Die Zellen werden einmal mit FACS-Waschpuffer gewaschen und mit MHC-Tetramer gefärbt. Ohne die Zellen nach der Tetramerfärbung zu waschen, werden nun die Antikörper für die Oberflächenfärbung CD8-APC und TCRγδ-PC-5 zugegeben und für 13 min bei 4 °C inkubiert. Danach werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, aufgenommen in 100 µl Annexin-Puffer und mit 5 µl AnnexinV-FITC für 10 min inkubiert. Die Zellen werden im Durchflusszytometer analysiert.

4 Resultate

4.1 Das immunsuppressive Potential humaner DN T-Zellen

4.1.1 DN T-Zellen bei gesunden Spendern

Der Anteil $CD4^- CD8^-$ doppeltnegativer (DN) T-Zellen im peripheren Blut ist sehr gering. So beträgt die Frequenz bei gesunden Spendern ($n = 19$) 4% aller $CD3^+$ T-Lymphozyten (siehe Abb. 3 A). Etwa 80% der DN T-Zellen tragen den T-Zell-Rezeptor (TCR) $\gamma\delta$, 20% exprimieren den TCR $\alpha\beta$ (Abb. 3 B). Da die DN T-Zellen eine heterogene Zellpopulation darstellen und zu einem kleinen Anteil auch sog. NK-T-Zellen (NK-Zell- und T-Zellmarker tragende Zellen) beinhalten, wurden zunächst mittels phänotypischer Analyse die verschiedenen Subpopulationen definiert.

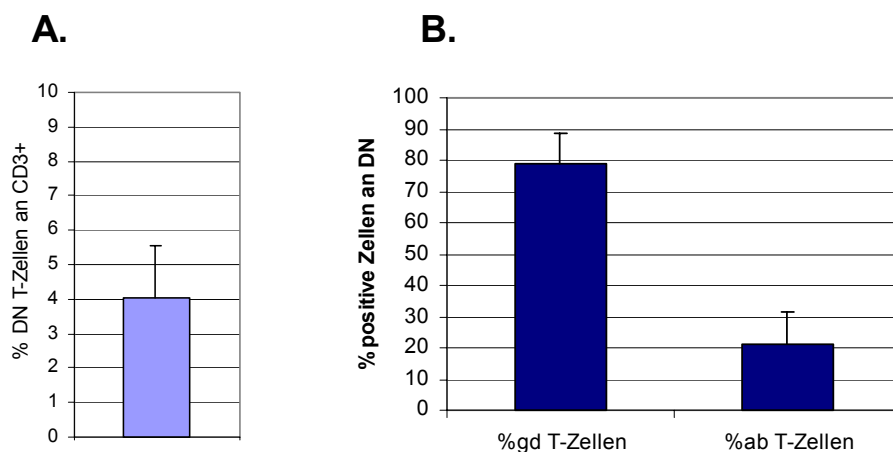


Abb. 3: **(A)** Die Frequenz von $CD3^+ CD4^- CD8^-$ DN T-Zellen anteilig an allen T-Lymphozyten im peripheren Blut gesunder Spender ($n = 19$). **(B)** Innerhalb der DN T-Zellen befinden sich etwa 80% TCR $\gamma\delta$ exprimierende und 20% TCR $\alpha\beta$ exprimierende T-Zellen ($n = 11$). Die Standardabweichung ist als Balken angegeben.

Bezüglich ihrer $CD3^+$ Expression können zwei Subpopulationen separiert werden: $CD3^{high} CD4^- CD8^-$ und $CD3^{low} CD4^- CD8^-$ T-Zellen (siehe Abb. 4, oberer linker Quadrant). Die $CD3^{high}$ Population (Abb. 4 B, R2) besteht vorwiegend aus DN T-Zellen, welche den TCR $\gamma\delta$ exprimieren, während die $CD3^{low}$ Population überwiegend aus TCR $\alpha\beta^+$ besteht. Über eine mögliche funktionelle Bedeutung der erhöhten $CD3$ Expression der TCR $\gamma\delta$ T-Zellen ist derzeit nichts bekannt. Eine weitere phänotypische Untersuchung dieser DN T-Zell-Subpopulationen ist in Abb. 5 dargestellt.

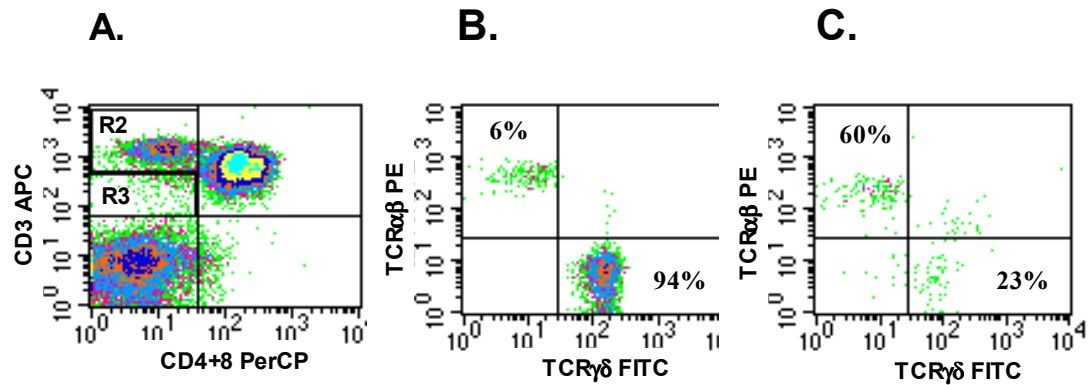


Abb. 4: Durchflusszytometrische Analyse von DN T-Zellen, dargestellt im Dichtediagramm. (A) Nach der Oberflächenfärbung mit anti-CD3-APC und anti-CD4/CD8 PerCP (im selben Kanal) befinden sich die DN T-Zellen im linken oberen Quadranten. Die DN T-Zellen enthalten eine dominierende Population von $CD3^{high}$ exprimierenden Zellen (Region R2) und eine kleinere Population von $CD3^{low}$ exprimierenden DN T-Zellen (Region 3). (B) Die $CD3^{high}$ Population (R2) enthält vorwiegend $TCR\gamma\delta^{+}$ T-Zellen, während die $CD3^{low}$ Population (Region R3) überwiegend aus $TCR\alpha\beta^{+}$ DN T-Zellen besteht (C).

DN T-Zellen der $CD3^{high}$ Fraktion, welche vorwiegend $TCR\gamma\delta^{+}$ sind, exprimieren bzw. koexprimieren überwiegend CD45RO, der klassischerweise ein Marker für Memory/Effektor-Zellen ist (Abb. 5, rote Säulen). Die $CD3^{high}$ Fraktion enthält außerdem einen Anteil von 40% $CD56^{+}$ NK-T-Zellen (Abb. 5). Die $CD3^{low}$ DN T-Zellpopulation enthält vorwiegend $TCR\alpha\beta^{+}$ CD45RA⁺ Zellen, ein Marker für naive Zellen (Abb. 5, blaue Säulen). Bezüglich des Markers CD25⁺ (Aktivierungsmarker) bestehen keine Unterschiede in den Subpopulationen.

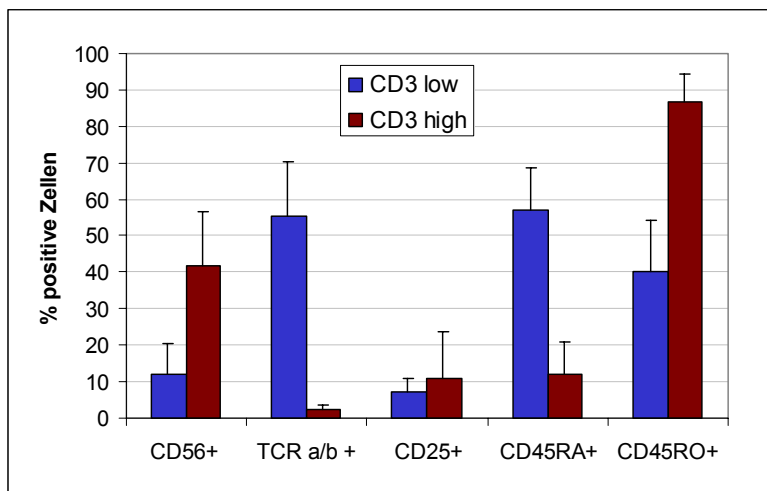


Abb. 5: Phänotypisierung humaner $CD3^{high}$ und $CD3^{low}$ DN T-Zell-Subpopulationen. Exemplarisch an zwei gesunden Spendern ist das Ergebnis der phänotypischen Analyse der $CD3^{high}$ und $CD3^{low}$ DN T-Zell-Population dargestellt: NK-Marker(CD56)-tragende DN T-Zellen (NK-T-Zellen) befinden sich vorwiegend in den $CD3^{high}$ DN T-Zellen. Die $TCR\alpha\beta^{+}$ T-Zellen befinden sich ausschließlich in der $CD3^{low}$ Fraktion. Die $CD3^{low}$ Population beinhaltet vorwiegend $CD45RA^{+}$ T-Zellen, wohingegen Zellen der $CD3^{high}$ DN T-Zell-Fraktion fast ausschließlich den $CD45RO^{+}$ Marker exprimieren oder koexprimieren.

4.1.2 Gewinnung von DN T-Zellen

4.1.2.1 Ex vivo Aufreinigung von DN T-Zellen

Für die Aufreinigung von DN T-Zellen mittels Fluoreszenzsortierung mussten die Zellen zunächst magnetisch voraufgereinigt werden. Dies ist notwendig, da die Frequenz der DN T-Zellen innerhalb der MNC so gering ist, dass im Fluoreszenzsortierer bei einer Beschränkung der Analysefrequenz auf 2500 Zellen/s ein Sortiervorgang zeitlich zu lange

dauern würde. Die MNC wurden aus buffy coats gewonnen und danach voraufgereinigt: Dafür wurden zunächst $CD4^+$, $CD8^+$, $CD14^+$, $CD56^+$, $CD19^+$, $CD61^+$ und Glykophorin-A⁺ Zellen magnetisch mittels Beads der Fa. Dynal depletiert (Protokoll siehe Methodenteil 3.2.16.2; S. 46). Dabei konnten die $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zellen bis zu 20% angereichert werden. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti- $TCR\gamma\delta$ -PC-5 gefärbt und fluoreszenzsortiert. Die Färbung mit monoklonalen Antikörpern für die Isolierung von $TCR\alpha\beta^+$ DN T-Zellen wurde mit anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti- $TCR\alpha\beta$ -PC-5 durchgeführt. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 15%. Die Reinheit der fluoreszenzsortierten, vitalen DN T-Zellen lag bei 98% (siehe Abb. 6 A). Da $TCR\alpha\beta^+$ DN T-Zellen zu einem geringeren Prozentsatz im peripheren Blut vorhanden sind als $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zellen (siehe Abb. 3), war die Klonierung von $TCR\alpha\beta^+$ DN T-Zellen für funktionelle Untersuchungen essentiell, während die fluoreszenzsortierten $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zellen für Funktionstests verwendet werden konnten.

Dennoch bot sich für die Isolierung von $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zellen ein rein magnetisches Verfahren an: $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zellen können mittels Beads der Fa. Miltenyi (siehe Materialteil, Abschnitt 3.1.8) über Säulen positiv angereichert werden. Die Ausbeuten lagen mit ca. 57% sehr viel höher als bei der fluoreszenten Zellsortierung. Die Reinheit der Zellen war geringfügig niedriger: 94% der isolierten Zellen waren $TCR\gamma\delta^+$ und $CD3^+$, 91% der Zellen hatten einen $CD4^- CD8^-$ Phänotyp (siehe Abb. 6 B). Die Säulenaufreinigung erzielte deswegen gute Reinheiten, weil als Ausgangsmaterial eine vorangereicherte T-Zell-Fraktion aus der Elutriation verwendet wurde. In dieser Fraktion sind keine Monozyten vorhanden. Da Monozyten zur unspezifischen Bindung von Antikörpern neigen, werden Monozyten bei Positivselektionen häufig mitangereichert. Dieses Problem kann jedoch durch die Verwendung Monozyten-depletierter Zellfraktionen umgangen werden. Die magnetisch isolierten DN T-Zellen wurden vorwiegend für die allogenen Versuchsansätze von Abschnitt 4.1.5.2 (S. 66) eingesetzt. Ein rein magnetisches Verfahren zur Aufreinigung von $TCR\alpha\beta^+$ DN T-Zellen ist derzeit nicht verfügbar.

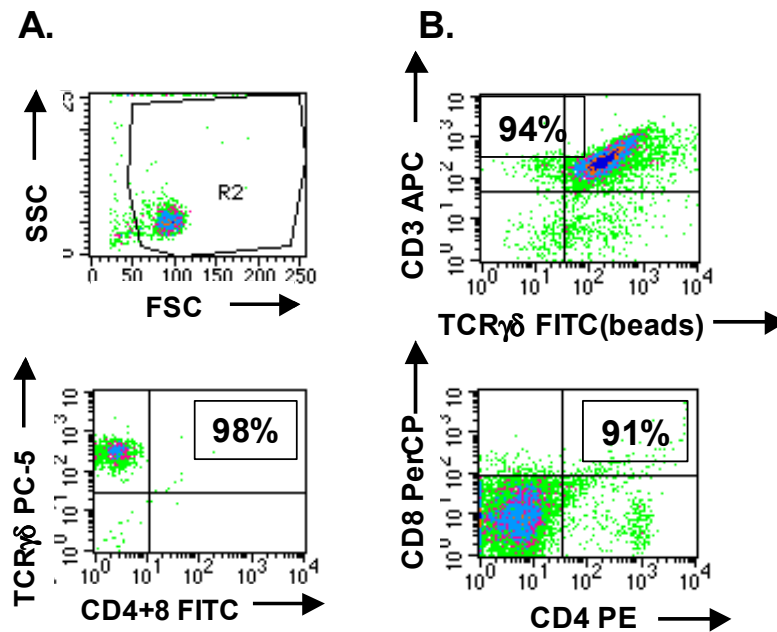


Abb. 6: Aufreinigung von DN T-Zellen nach zwei verschiedenen Methoden. (A) Die Zellen wurden nach der Dynal-Methode voraufgereinigt und anschließend mittels fluoreszenter Zellsortierung hochrein isoliert. Nach der fluoreszenten Zellsortierung sind 98% der Zellen $CD4^- CD8^-$. (B) $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zellen nach der Miltenyi-Methode über eine magnetische Positiv-Anreicherung aus der T-Zell-Fraktion der Elutriation isoliert. An die positiv-angereicherten Zellen haben FITC-konjugierte Beads gebunden. Gezeigt ist jeweils ein Einzelbeispiel. Die Färbung nach den jeweiligen Oberflächenmarkern ist gekennzeichnet.

4.1.2.2 DN T-Zell-Klone

Zur funktionellen Charakterisierung von $CD3^+$ DN T-Zellen wurden $TCR\alpha\beta^+$ und $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zell-Klone generiert, um deren immunregulatorische Funktion zu untersuchen. Da vor allem die $TCR\alpha\beta^+$ DN T-Zellen in einer sehr niedrigen Frequenz im peripheren Blut vorhanden sind, war für die funktionellen Analysen der $TCR\alpha\beta^+$ DN T-Zellen die Verwendung von T-Zell-Klonen essentiell. Die Klone wurden im Laufe ihrer Expansion wöchentlich mit Feederzellen restimuliert. Die phänotypische Analyse eines $TCR\alpha\beta^+$ DN T-Zell-Klons ist exemplarisch am Klon 1D6 in Abb. 7 gezeigt. Für die funktionellen Analysen wurden ausschließlich Klone verwendet, deren Restimulation mindestens vier Tage zurücklag.

Auch $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zell-Klone wurden generiert. Eine phänotypische Analyse ist in Abb. 8 gezeigt. Die Ausbeuten an Klonen waren für die Klonierung von $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zellen etwas besser als bei $TCR\alpha\beta^+$ DN T-Zellen. Etablierte Klone beider Subpopulationen expandierten jedoch ähnlich gut über mehrere Wochen.

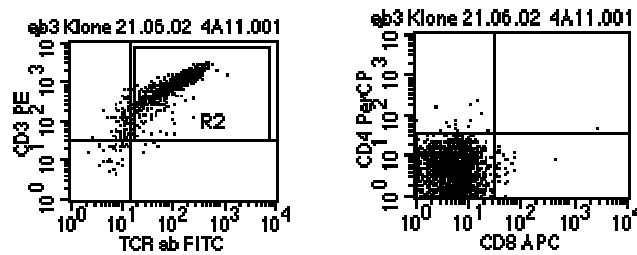


Abb. 7: TCR $\alpha\beta^+$ DN T-Zell Klon 1D6. Dieser Klon exprimiert CD3 und TCR $\alpha\beta$, ist jedoch für CD4 und CD8 negativ. Dieser Klon wurde aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders gewonnen und über mehrere Wochen mit allogenen Feederzellen expandiert.

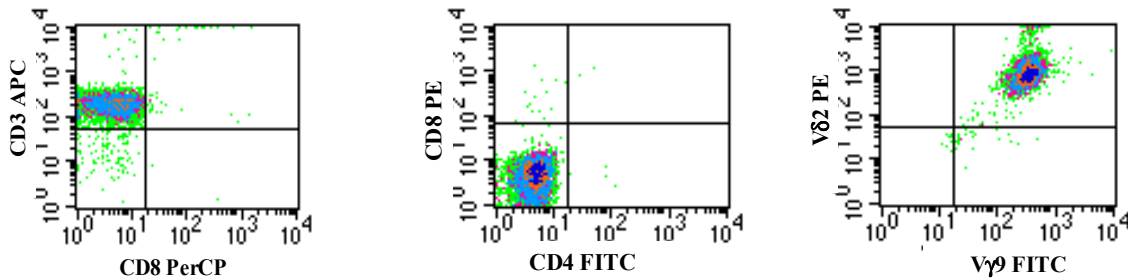


Abb. 8: Der CD3 $^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ DN T-Zell-Klon 3Z8 wurde aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders gewonnen, exprimiert V γ 9 V δ 2 und stammt somit aus der häufigsten Subpopulation peripherer TCR $\gamma\delta$ T-Zellen.

4.1.3 Zytokinsekretionsmuster von DN T-Zellen

Von drei Klonen (1C1, 3D3 und 3C2) wurde die Zytokinsekretion analysiert. Dafür wurden die Klone der Expansionskultur entnommen, wobei die Restimulation bei allen Klonen mindestens vier Tage zurücklag. Die Klone wurden gewaschen und in T-Zell-Medium bei 37° C gehalten (Klon 3C2 für 24 h, Klon 1C1 und 3D3 für 48 h).

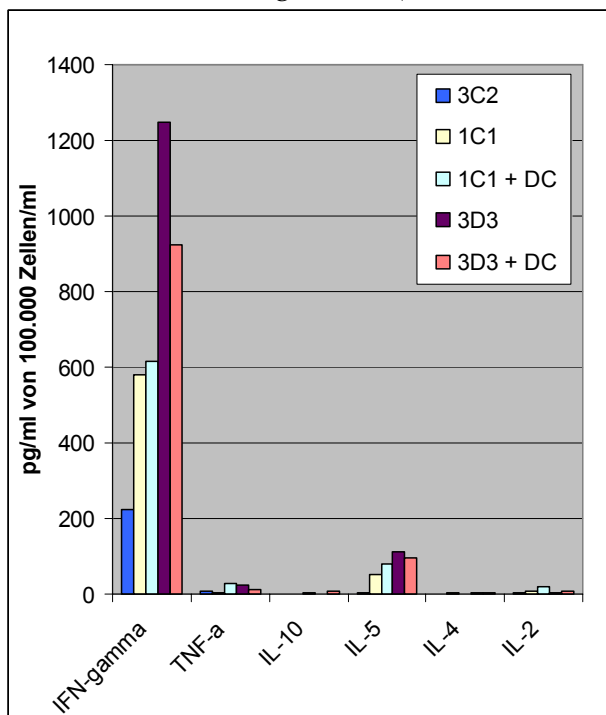


Abb. 9: Analyse der Zytokinsekretion humaner TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zell-Klone. Dargestellt ist die Menge an Zytokinen in 1 ml Überstand, welche von 100.000 Zellen sezerniert wurden. Es wurde IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-5, IL-4 und IL-2 untersucht. Der Klon 3C2 wurde für 24 h, die Klone 1C1 und 3D3 für 48 h in T-Zell-Medium gehalten.

Zusätzlich wurden für die Klone 1C1 und 3D3 Überstände generiert, in welchen zusätzlich 100.000 allogene DC anwesend waren. Die Ermittlung der Zytokinmengen erfolgte durchflusszytometrisch mit Hilfe der CBA Methode (Methodenteil, siehe 3.2.20). Die Absolutmenge der Zytokine ist in pg angegeben.

TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zell-Klone produzieren vorwiegend IFN- γ (Abb. 9). Außerdem wird von 100.000 TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zellen bis zu 100 pg/ml IL-5 und bis zu 30 pg/ml TNF- α produziert. Dieses Zytokinmuster zeigte sich bei allen Klonen. Es scheint sich dabei um eine konstitutive Expression der Zytokine zu handeln, da die Zytokinmenge mit der Kulturdauer korreliert (Abb. 9, vergleiche 24 h-Überstände von Klon 3C2 mit 48 h-Überständen von 1C1 und 3D3). Eine zusätzliche Kokultur mit allogenen, reifen DC bei Klon 1C1 und 3D3 ergibt keine zusätzliche Zytokinproduktion der DN T-Zellen. Die TCR $\alpha\beta^+$ DN T-Zell-Klone wurden auf ihre Zytokinexpression bisher nicht untersucht.

4.1.4 Transfer von pMHC-Komplexen

4.1.4.1 Aufnahme von pMHC-Komplexen durch DN T-Zellen

Im folgenden Abschnitt werden Daten über den Transfer von pMHC-Komplexen von APC auf DN T-Zellen dargestellt. Der Transfer von pMHC-Komplexen ist ein wesentlicher Teil des Modells der spezifischen Suppression von Zhang et al. [28]. Erst durch den Transfer von Peptid-MHC(pMHC)-Komplexen auf die Oberfläche von DN T-Zellen werden die DN T-Zellen im Mausmodell befähigt, Antigen-spezifisch Suppression zu vermitteln. Die akquirierten pMHC-Moleküle fungieren als Effektormoleküle, mit denen DN T-Zellen in Kontakt zum T-Zell-Rezeptor der aktivierten T-Zellen treten und diese anschließend lysieren (Modell siehe Einleitung, Abb. 1). Mittels Antikörperbindungsstudien soll der Nachweis für einen pMHC-Transfer von humanen APC auf DN T-Zellen erbracht werden.

Hierfür wurden HLA-A2 negative DN T-Zellen mit HLA-A2 positiven DC für 38 h bei 37 °C koinkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden mit Hilfe eines spezifischen anti-HLA-A2 monoklonalen Antikörpers (Klon BB7.2) HLA-A2-Moleküle auf der Zelloberfläche von DN T-Zellen nachgewiesen. Als Kontrolle diente die Bindung des Isotypen an die kultivierten DN T-Zellen. Die DN T-Zellen wurden im Durchflusszytometer anhand des Streulichtes gated (Abb. 10, obere Reihe) und auf die Bindung des Antikörpers untersucht (Abb. 10, untere Reihe).

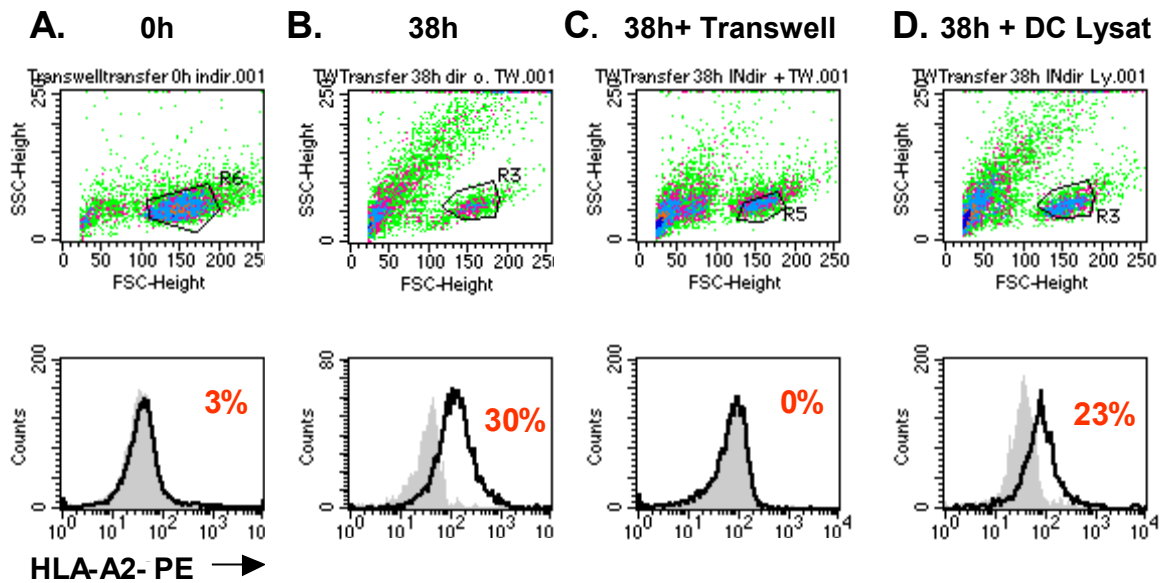


Abb. 10: Kokultorexperimente des TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zell-Klons 3B2 von einem HLA-A2 negativen Spender mit reifen HLA-A2⁺ DC. Dargestellt ist das Bindungsverhalten des PE-konjugierten anti-HLA-A2-Antikörpers (Klon BB7.2) an die Oberfläche von DN T-Zellen vor (A) und nach 38h der Kokultur mit DC (B). Werden die DN T-Zellen und die reifen DC durch eine Transwellmembran voneinander getrennt, so unterbleibt die Bindung des Antikörpers an die DN T-Zellen (C). Statt vitalen DC wurde auch ein Lysat von DC eingesetzt (D). Grau: Bindung der Isotypenkontrolle, Schwarze Linie: Bindung des PE-konjugierten anti-HLA-A2-Antikörpers. Die Dichteplots in der oberen Reihe zeigen das Gating auf die kultivierten DN T-Zellen. Die angegebenen Prozentzahlen stehen für HLA-A2-positiv gewertete Zellen im Vergleich zur Isotypkontrolle.

Wie in Abb. 10 gezeigt, bindet nach einer Kokulturphase von DN T-Zellen mit DC ein anti-HLA-A2 monoklonaler Antikörper an die zuvor HLA-A2 negativen DN T-Zellen. Es kommt zu einer gleichmäßigen Verschiebung der Fluoreszenzintensität in der gesamten DN T-Zell-Population (Abb. 10, vgl. A und B). Dieses Resultat weist darauf hin, dass es zu einem Transfer von HLA-A2-Molekülen gekommen sein muss. Zur Untersuchung der Bedeutung des Zell-Zell-Kontaktes für den Transfer von pMHC-Komplexen wurden Transwellkammern verwendet. Das Prinzip der Transwellkammer besteht darin, dass eine Membran (Porengröße 0,4 μm) den Zell-Zell-Kontakt zwischen den DC (obere Kammer) und den DN T-Zellen (untere Kammer) verhindert, während der Austausch löslicher Faktoren möglich ist. Es konnte gezeigt werden, dass der Transfer von HLA-A2-Molekülen durch die Kokultur von DN T-Zellen und DC im Transwellsystem unterbunden wird (siehe Abb. 10 C), wodurch gezeigt ist, dass der Zell-Zell-Kontakt essentiell ist und lösliche Faktoren den Transfer nicht vermitteln können.

Werden die DN T-Zellen mit Lysaten von DC (nach dreimaligem Einfrier- und Auftauzyklus) kokubiert, findet ebenfalls ein Transfer von pMHC-Molekülen statt (Abb. 10 D). Dies lässt darauf schließen, dass die pMHC-Komplexe auch von Membranfragmenten akquiriert werden können und die DC eher eine passive Funktion im Transferprozess einnehmen. Anschließend wurde die Kinetik des pMHC-Transfers untersucht.

Dafür wurde wie in den Versuchen zuvor eine Kokultur von fluoreszenzsortierten DN T-Zellen und DC angelegt und die Bindung des anti-HLA-A2 spezifischen monoklonalen Antikörpers nach unterschiedlich langer Kokultur untersucht. Naive $CD8^+$ T-Zellen wurden in diesem Experiment als Kontrollzellen verwendet. Durch eine Färbung mit einem $TCR\gamma\delta$ -PC-5 Antikörper konnte auf die DN T-Zellen gaged werden.

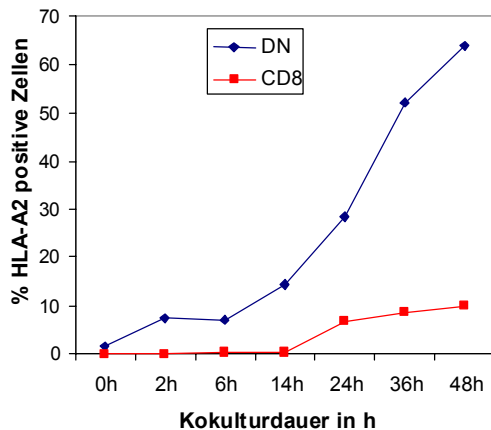


Abb. 11:

Transfer von pMHC-Molekülen von $HLA-A2^+$ DC auf $HLA-A2^-$ DN T-Zellen. Nach einer Kokultur von DC und DN T-Zellen zwischen 2 und 48 h wurden die Zellen mit einem unkonjugierten, monoklonalen anti-HLA-A2-Antikörper inkubiert. Die Bindung des anti-HLA-A2 Antikörpers wurde mit einem sekundären Ziege-anti-Maus-PE Antikörper detektiert und die Expression von HLA-A2 in der Lymphozytenregion durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrolle dienten sortierte $CD8^+$ T-Zellen des gleichen Spenders.

Nach einer Kokultur von 48 h sind etwa 65% der DN T-Zellen positiv für HLA-A2 (Abb. 11). Es kommt zu einer zeitabhängigen Akkumulation von pMHC-Komplexen auf der Zelloberfläche von DN T-Zellen. Im Gegensatz dazu nehmen naive $CD8^+$ T-Zellen desselben Spenders nur sehr wenige HLA-A2-Moleküle auf.

Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob beide Subpopulationen von DN T-Zellen in der Lage sind, pMHC-Moleküle aufzunehmen. Hierfür wurden im selben Versuchsaufbau fluoreszenzsortierte $TCR\alpha\beta^+$ und $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zellen eingesetzt. Es zeigte sich, dass prinzipiell beide DN T-Zell-Subpopulationen in der Lage sind, pMHC-Moleküle zu akquirieren (Abb. 12).

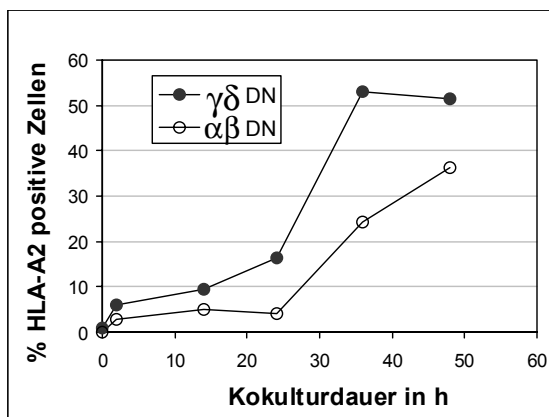


Abb. 12:

Transfer von HLA-A2-Molekülen von $HLA-A2^+$ DC auf $HLA-A2^-$ $TCR\alpha\beta^+$ und $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zellen. Nach der Kokultur von reifen DC mit DN T-Zell-Subpopulationen können HLA-A2-Moleküle sowohl auf der Zelloberfläche von $TCR\alpha\beta^+$ als auch $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zellen nachgewiesen werden. $TCR\gamma\delta^+$ und $TCR\alpha\beta^+$ DN T-Zellen wurden durch Fluoreszenzsortierung vom selben Spender gewonnen. Dieses ist ein Einzelexperiment.

4.1.4.2 Abgabe von pMHC-Komplexen durch verschiedene Immunzellen

Um der Frage nachzugehen, welche Immunzellen in der Lage sind, pMHC-Komplexe abzugeben, wurden verschiedene Zelltypen desselben $HLA-A2^+$ gesunden Spenders

angereichert und als pMHC-Donoren eingesetzt (siehe Versuchsaufbau, Abb. 13 A): als pMHC-Donorzellen wurden aus einem Leukapheresat eines HLA-A2⁺ Spenders über Elutriation Monozyten und Lymphozyten isoliert. Aus den Monozyten wurden über 7 Tage DC generiert, welche ohne Differenzierungsstimulus (unreife DC) oder nach Differenzierungsstimulus für zwei Tage (reife DC) verwendet wurden. Kryokonservierte Monozyten und T-Zellen wurden für den Versuch aufgetaut. Die Monozyten wurden über eine magnetische CD14⁺ Positivselektion isoliert, die T-Zellen ebenfalls über CD4 und CD8 separat magnetisch aufgereinigt und zuletzt wieder etwa im Verhältnis 2/3 : 1/3 vereinigt, um in etwa das natürliche Verhältnis von Helfer- und Killerzellen im peripheren Blut nachzubilden. Durch diese Aufreinigungsschritte konnten sehr reine Fraktionen von pMHC-Komplex-Donoren erreicht werden (siehe Abb. 13 C und D). Auch die unreifen und reifen DC wurden phänotypisch untersucht (Abb. 13 B) Sie unterschieden sich vorwiegend bezüglich der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und der CD83-Expression, welche auf den reifen DC hochreguliert wird.

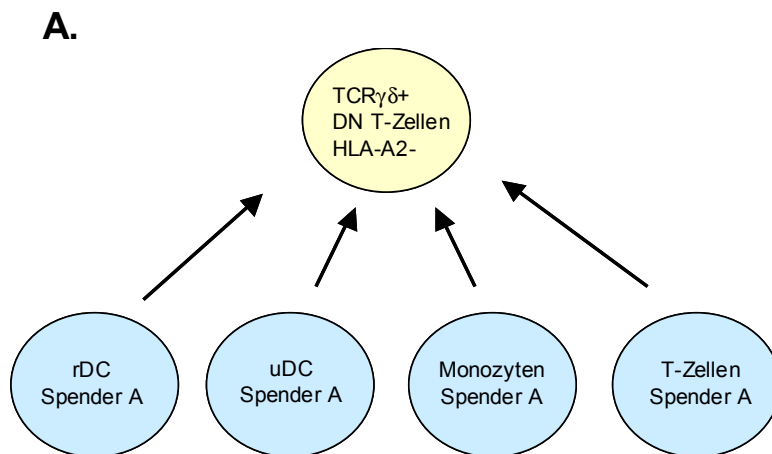
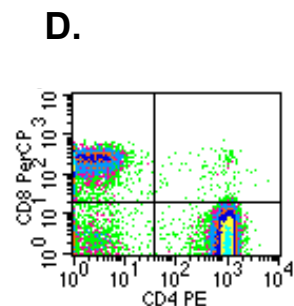
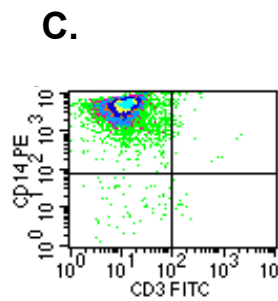
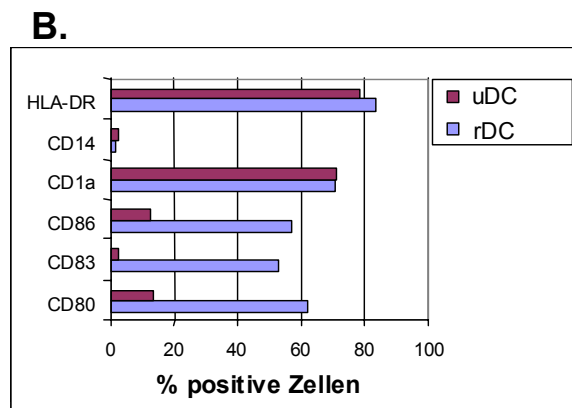


Abb. 13: Transfer von HLA-A2-Molekülen von verschiedenen pMHC-Donorzellen auf DN T-Zellen. (A) Schematischer Versuchsaufbau: Als pMHC Donoren wurden verschiedene Immunzellen eines HLA-A2⁺ Spenders A verwendet: reife dendritische Zellen (rDC), unreife dendritische Zellen (uDC), Monozyten und T-Zellen. Der Phänotyp der pMHC-Donorzellen von Spender A ist gezeigt für rDC und uDC (B), CD14⁺ Monozyten (C) und eine Mischung von T-Zellen (D).



Nach einer Kokulturdauer von 12 h, 24 h, 36 h und 48 h wurden die HLA-A2⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen über eine anti-TCR $\gamma\delta$ -PC-5 Antikörperfärbung gated und auf die Expression von HLA-A2-Molekülen untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Kokultur mit reifen DC sehr effektiv zum Transfer von HLA-A2-Molekülen führt, wohingegen unreife DC schlechter pMHC-Komplexe abgeben (siehe Abb. 14). Auf den mit HLA-A2⁺ Monozyten bzw. T-Zellen kokultivierten DN T-Zellen konnten keinerlei HLA-A2-Moleküle nachgewiesen werden. Dabei bleibt unklar, ob es tatsächlich zu keinem Transfer von pMHC-Molekülen gekommen ist, oder ob die Anzahl der transferierten Moleküle unter der Nachweisgrenze der durchflusszytometrischen Analyse liegt.

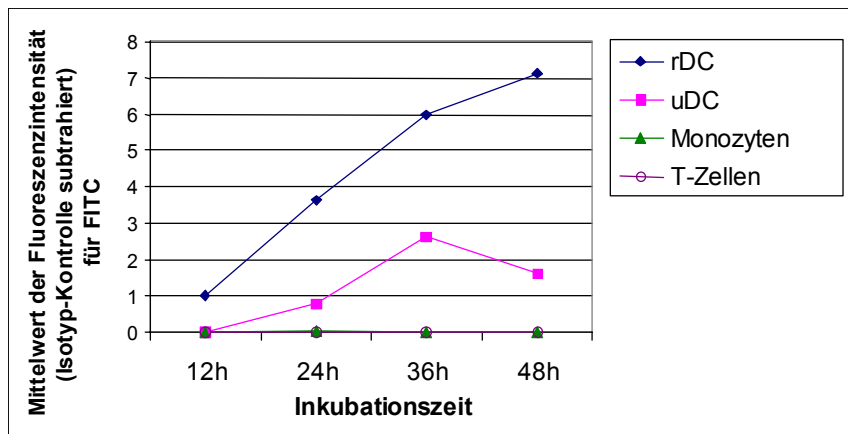


Abb. 14: Transfer von HLA-A2-Molekülen von verschiedenen HLA-A2⁺ Donorzellen auf HLA-A2⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen. Die Ansätze mit den verschiedenen HLA-A2-Donorzellen sind mit unterschiedlichen Symbolen dargestellt: Reife DC (rDC), unreife DC (uDC), Monozyten und T-Zellen. Nachweis der HLA-A2-Moleküle mittels eines unkonjugierten anti-HLA-A2 Primär-Antikörpers und eines sekundären Ziege-anti-Maus-FITC Antikörpers.

Es ist unklar, ob die Beschränkung der Abgabe von pMHC-Komplexen auf DC ein spezifisches Merkmal dieser Zellen ist, oder ob dies einfach mit der hohen HLA-A2-Oberflächenexpression, d.h. der Verfügbarkeit der zu transferierenden pMHC-I-Komplexe zusammenhängt. Aus diesem Grund wurde die Oberflächenexpression von pMHC-Komplexen der verschiedenen pMHC-Donorzellen untersucht.

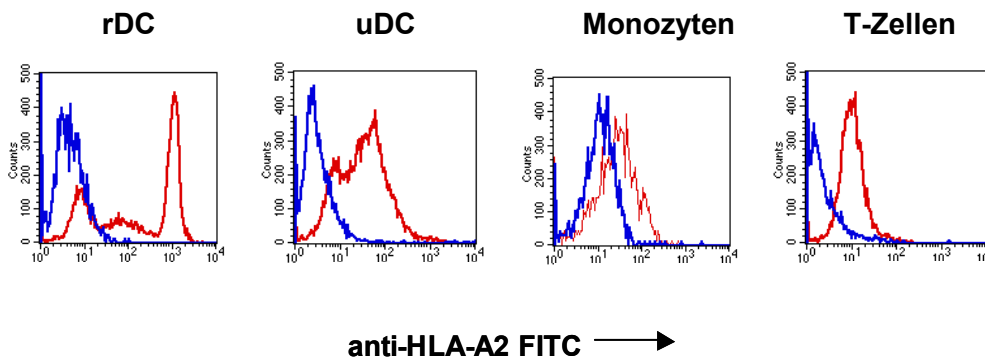


Abb. 15: Oberflächenexpression von HLA-A2-Molekülen auf den verschiedenen pMHC Donoren. Reife DC (rDC) haben die höchste MHC-I Expression, gefolgt von unreifen DC (uDC), Monozyten und T-Zellen. Blau: Bindung der Isotyp-Kontrolle; Rot: Bindung des unkonjugierten HLA-A2 Antikörpers nachgewiesen mittels eines Ziege-anti-Maus Sekundärantikörpers.

Dabei zeigte sich, dass unreife DC weniger HLA-A2 auf der Oberfläche tragen als reife DC (vgl. Abb. 15). Eine Hochregulation von MHC-I-Molekülen im Laufe der DC-

Maturierung ist in der Literatur beschrieben [191]. Die geringste Expression von HLA-A2 wiesen Monozyten und T-Zellen auf. Somit könnte die Oberflächendichte von HLA-A2-Molekülen auf den pMHC-Donoren eine mögliche Erklärung für den unterschiedlich starken Transfer auf DN T-Zellen sein. Diese Hypothese muss jedoch noch abschließend geprüft werden.

4.1.4.3 pMHC-Transfer durch T2 Zellen

Die HLA-A2⁺ Zelllinie T2 weist auf Grund eines Defektes im Transporterprotein TAP auf ihrer Zelloberfläche nur unbeladene pMHC-Bindungsstellen auf, die exogen mit Peptiden beladen werden können. Da T2 Zellen ebenfalls zum pMHC-Transfer in der Lage sind, wurde anhand dieses Systems untersucht, welche Rolle die Peptidbeladung für den pMHC-Transfer spielt, bzw. ob die Peptidbeladung des MHC eine wichtige Voraussetzung für den Transfer ist.

In Kokultorexperimenten wurde der HLA-A2 negative TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zell-Klon 3B3 mit unterschiedlich beladenen T2 Zellen koinkubiert und dann mit einem anti-HLA-A2-spezifischen monoklonalen PE-markierten Antikörper der Transfer von HLA-A2-Molekülen von T2 auf DN T-Zellen untersucht. Als pMHC-Donoren wurden unbeladene bzw. mit 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 0,3 ng/ml Melan-A- bzw. gp100-Peptid-beladene T2 Zellen verwendet. Wie in Abb. 16 dargestellt, können auf der Oberfläche von HLA-A2⁻ DN T-Zellen (Abb. 16 A) nach einer 38-stündigen Kokultur mit T2 Zellen HLA-A2-Moleküle nachgewiesen werden.

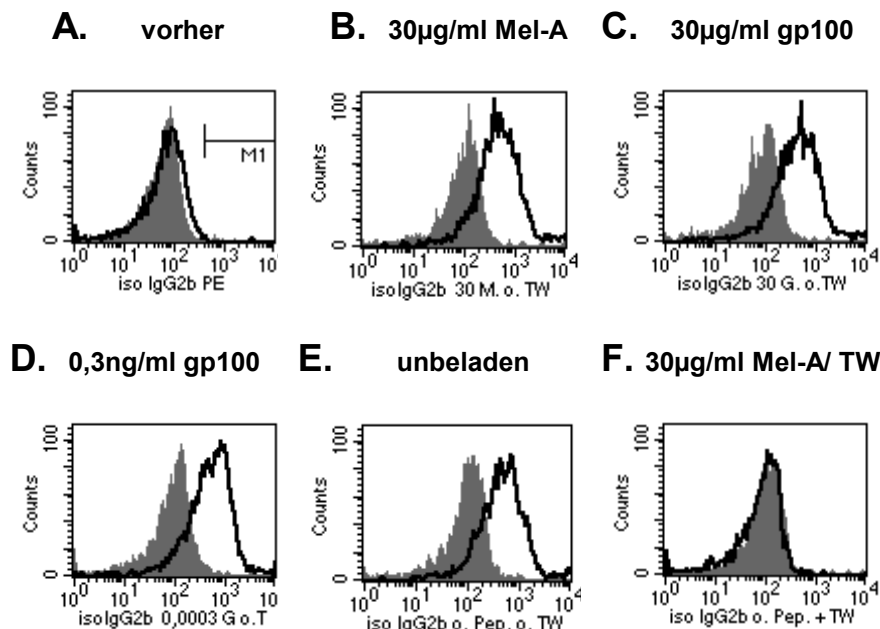


Abb. 16:

HLA-A2 Transfer von T2 Zellen auf DN T-Zellen.

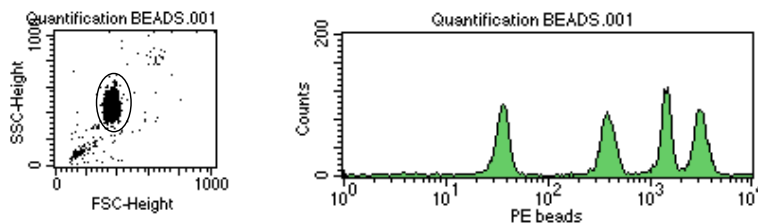
Der HLA-A2 negative DN T-Zell-Klon 3B3 (A, vor Kokultur) wurde für 38 h mit HLA-A2⁺ T2 Zellen als pMHC-Donoren koinkubiert. Die T2 Zellen wurden zuvor mit folgenden Peptiden beladen: 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Melan-A-Peptid (B), 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gp100 (C), 0,3 ng/ml gp100 (D). Auch unbeladene T2 wurden als pMHC-Donoren verwendet (E). pMHC-Transfer mit T2 Zellen im Transwell-System (F). Graue Histogramme: Bindung der Isotyp-Kontrolle, schwarze Linien: Bindung des anti-HLA-A2 spezifischen, monoklonalen, PE-konjugierten Antikörpers.

Der pMHC-Transfer von T2 Zellen auf DN T-Zellen findet unabhängig von der Peptidbeladung (Abb. 16 B, C, E) bzw. der Peptidkonzentration (Abb. 16 C und D) statt.

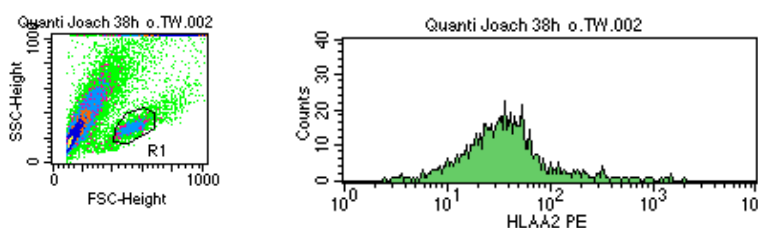
Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Transfer ein unspezifischer Prozess ist und nicht über eine spezifische Interaktion zwischen dem TCR und dem pMHC-Komplex vermittelt wird. Weiter ist der Transfer von pMHC-Komplexen von T2 Zellen auf DN T-Zellen durch Trennung der beiden Zellen mit einer Transwell-Membran inhibierbar (Abb. 16 F) und somit ein Zell-Zell-Kontakt-abhängiger Prozess.

Eine Quantifizierung der transferierten MHC-Moleküle von APC auf DN T-Zellen wurde mit Hilfe von Eisenpartikeln (Beads), die mit PE-Molekülen beschichtet sind, durchgeführt. Durch die Verwendung vier verschiedener Bead-Populationen, welche mit einer unterschiedlichen Zahl von PE-Molekülen beschichtet sind, kann das PE-Signal des anti-HLA-A2-Antikörpers kalibriert werden (siehe Abb. 17 A). Die Eichwerte und die Probe müssen dafür mit denselben Geräteeinstellungen aufgezeichnet werden. Für die DN T-Zellen, die mit APC kokultiviert wurden, wurde die Bindung des PE-konjugierten HLA-A2-Antikörpers ermittelt. Mit Hilfe der Eichgeraden konnte der Fluoreszenzintensität eine definierte Anzahl von PE-Molekülen zugeordnet werden. Da ein direkt-konjugierter PE-Antikörper verwendet wurde, ist die Anzahl ermittelter PE-Moleküle mit der Anzahl detektierter HLA-A2-Moleküle auf der Zelloberfläche von DN T-Zellen gleichzusetzen.

A.



B.



C.

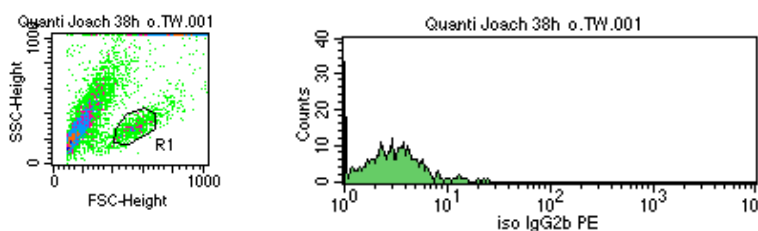


Abb. 17:

Durchflusszytometrische Quantifizierung transferierter pMHC-Moleküle von T2 Zellen auf DN T-Zellen. Als pMHC Donoren wurden mit 30 µg/ml Melan-A-Peptid-beladene T2 Zellen verwendet. Als pMHC Rezipient diente der TCRγδ⁺ DN T-Zell-Klon 3B3. Die Dauer der Kokultur betrug 2 Tage.

(A) Vier Subpopulationen von Beads, welche mit einer unterschiedlichen Menge von PE-Farbmolekülen beschichtet sind, wurden zur Eichung eingesetzt. Der Dotplot zeigt das Gating der Beads-Region (B) zeigt die Bindung des direkt-konjugierten anti-HLA-A2-Antikörpers an die DN-Zellen nach der Transferkultur. (C) Als Kontrolle wurde die Bindung eines direkt PE-konjugierten IgG2b Isotyps verwendet. Der Dotplot zeigt das Gating der DN T-Zellen.

Mit Hilfe dieser Methode konnten nach Abzug der Isotypkontrolle ca. 1200 HLA-A2-Moleküle auf der Oberfläche der kokultivierten DN T-Zellen nachgewiesen werden. Diese

Anzahl transferierter Moleküle konnte in einem weiteren Experiment mit demselben Klon, der mit DC eines anderen Spenders kokultiviert wurde, bestätigt werden.

4.1.4.4 Funktionalität transferierter pMHC-Moleküle

Eine der wichtigsten Fragen, die es zu beantworten galt, ist die Funktionalität der transferierten Moleküle. Hierfür wurde folgender Versuchsaufbau gewählt (Abb. 18):

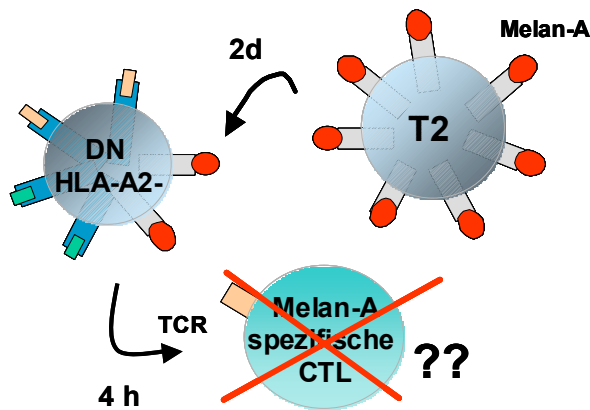


Abb. 18: Schema des Versuchsaufbaus zum Nachweis der Funktionalität transferierter pMHC-Moleküle auf der Oberfläche von DN T-Zellen. HLA-A2⁻ TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zell-Klone wurden in einer zweitägigen Konditionierungskultur mit Melan-A-beladenen T2 Zellen inkubiert. Nach der Konditionierungsphase wurden die DN T-Zellen mittels Fluoreszenzsortierung isoliert. Danach wurde die Kapazität der konditionierten DN T-Zellen getestet, Apoptose in Melan-A-spezifischen CTL zu induzieren. Die Apoptose Melan-A-spezifischer T-Zellen wurde im vierstündigen PKH26-Test bestimmt.

Während der Konditionierungskultur wurden DN T-Zell-Klone mit Melan-A-beladenen T2 Zellen koinkubiert. Im Laufe der zweitägigen Konditionierungsphase sollte der Transfer von Melan-A-MHC-Molekülen auf die Oberfläche von DN T-Zellen stattfinden. Im Anschluss daran wurden die konditionierten DN T-Zellen durch Fluoreszenzsortierung aus der Kokultur isoliert und in einen Apoptose-Test gegen Melan-A-spezifische CTL eingesetzt. Dabei wurde untersucht, ob die konditionierten DN T-Zellen nun zur Apoptose-Induktion von Melan-A-spezifischen CTL in der Lage sind. Die in diese Versuche eingesetzten Melan-A-spezifischen CD8⁺ CTL stammen von einem anderen, HLA-A2-positiven Spender. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt: Der Klon 3C3 wurde nach der Kokultur mit Melan-A-beladenen T2 Zellen über Fluoreszenzsortierung isoliert. Die T2 Zellen wurden über ihre CD20-Expression (anti-CD20-PE-Färbung) depletiert. Die Reanalyse des fluoreszenzsortierten Klons ergab eine sehr hohe Reinheit von DN T-Zellen (Abb. 19 A und B Dotplot) in der FSC/SSC-Darstellung. Zum Vergleich wurde der FSC/SSC reiner T2 Zellen mit denselben Geräteeinstellungen aufgezeichnet (Abb. 19 D).

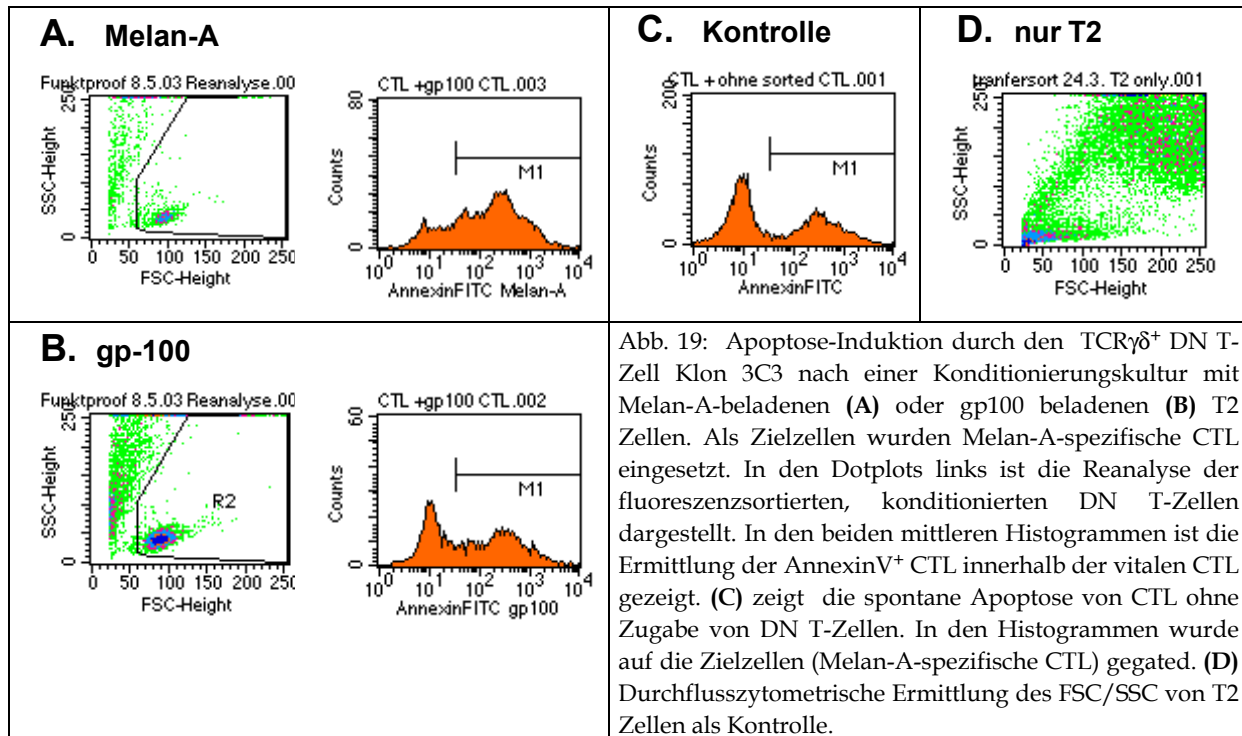


Abb. 19: Apoptose-Induktion durch den TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zell Klon 3C3 nach einer Konditionierungskultur mit Melan-A-beladenen (A) oder gp100 beladenen (B) T2 Zellen. Als Zielzellen wurden Melan-A-spezifische CTL eingesetzt. In den Dotplots links ist die Reanalyse der fluoreszenzsortierten, konditionierten DN T-Zellen dargestellt. In den beiden mittleren Histogrammen ist die Ermittlung der AnnexinV⁺ CTL innerhalb der vitalen CTL gezeigt. (C) zeigt die spontane Apoptose von CTL ohne Zugabe von DN T-Zellen. In den Histogrammen wurde auf die Zielzellen (Melan-A-spezifische CTL) gated. (D) Durchflusszytometrische Ermittlung des FSC/SSC von T2 Zellen als Kontrolle.

Der mit Melan-A-beladenen T2 Zellen konditionierte DN T-Zell-Klon 3C3 ist in der Lage, Apoptose in Melan-A-spezifischen CTL induzieren (Abb. 19 A, Histogramm). Der apoptotische Anteil liegt deutlich über der Hintergrundapoptose in den CTL (Abb. 19 C). Wurde jedoch der Klon 3C3 mit T2 Zellen konditioniert, die mit einem irrelevanten Peptid (gp100) beladen sind, so konnten diese Zellen in Melan-A-spezifischen CTL keine gesteigerte Apoptose induzieren (Abb. 19 B). Werden irrelevante gp100-MHC-Moleküle auf die DN T-Zellen übertragen, so sind die DN T-Zellen zu keiner Apoptose befähigt. In einem weiteren Test, in welchem die beiden HLA-A2 negativen DN T-Zell-Klone 3C2 und 1C1 verwendet wurden, waren ebenfalls nur diejenigen DN T-Zellen zur Apoptose-Induktion befähigt, die aus einer Konditionierungskultur mit Melan-A-beladenen T2 Zellen isoliert wurden (Abb. 20). Werden für die Konditionierungskultur T2 Zellen verwendet, die mit dem irrelevanten Peptid (gp100) beladen wurden, so sind die Klone nicht zur Apoptose-Induktion in der Lage. Wird die Konditionierungskultur mit Melan-A-beladenen T2 Zellen im Transwell-System durchgeführt, induzieren die DN T-Zellen ebenfalls keine Apoptose in der CTL-Linie. DN T-Zellen aus einer Konditionierungskultur mit T2 Zellen, die mit einer wesentlich geringeren Menge von 0,3 ng/ml Melan-A-Peptid beladen wurden, konnten ebenfalls keine Apoptose in Melan-A-spezifischen CTL induzieren, d.h. dass die Menge der beladenen MHC-Komplexe auf den T2 Zellen die spätere Fähigkeit zur Apoptose-Induktion der DN T-Zellen beeinflusst. All diese Befunde sprechen dafür, dass funktionelle pMHC-Komplexe von T2 Zellen auf DN T-Zellen transferiert werden.

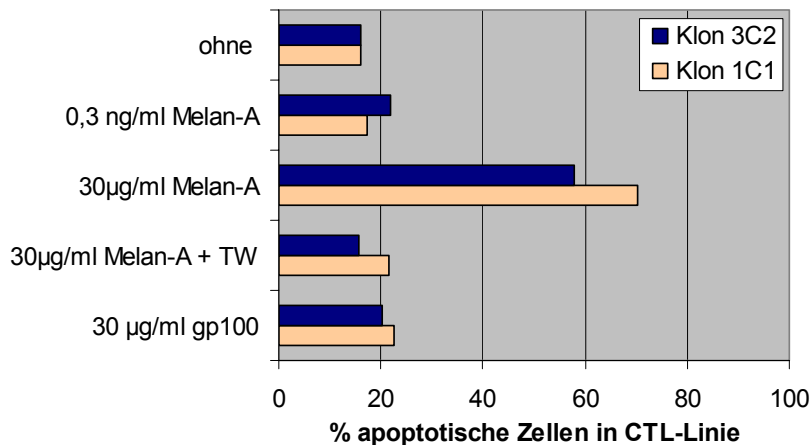


Abb. 20: Apoptose-Induktion in Melan-A-spezifischen CTL durch konditionierte DN T-Zell-Klone. Die DN T-Zell-Klone 3C2 und 1C1 wurden folgendermaßen konditioniert: ohne: spontane Apoptose; 0,3 ng/ml Melan-A; 30 µg/ml Melan-A; 30 µg/ml Melan-A im Transwellsystem (TW); 30 µg/ml gp100. Die Frequenz apoptotischer Melan-A-spezifischer CTL wurde mittels AnnexinV-Färbung ermittelt.

4.1.5 Apoptose-Induktion durch DN T-Zellen im allogenen System

4.1.5.1 Proliferationsinhibition einer MLR

Um die suppressive Funktion humaner DN T-Zellen näher zu beleuchten, wurde untersucht, inwiefern diese Zellen in der Lage sind, eine primäre gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte reaction, MLR) zu unterdrücken. Hierzu werden Responderzellen eines Spenders A mit bestrahlten Stimulatorzellen des Spenders B kokultiviert. Durch Zugabe von Suppressorzellen soll nun diese primäre MLR inhibiert werden.

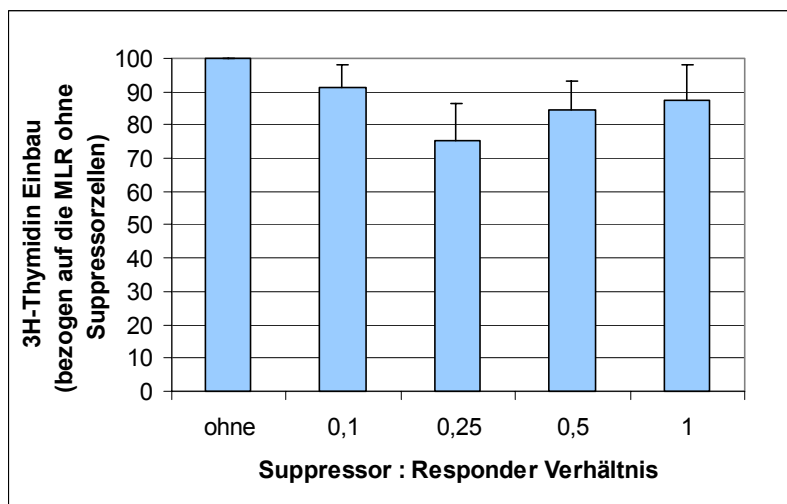


Abb. 21: Suppression einer primären MLR durch humane TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zellen. Responderzellen eines Spenders A wurden mit reifen DC von Spender B kultiviert. Aufsteigende Mengen von Suppressorzellen (Verhältnis 0,1 - 1 : 1) wurden zugegeben. Nach 5 Tagen wurde der Einbau von radioaktivem ^3H -Thymidin gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Proliferationstests, normiert auf die Werte des Kontrollansatzes ohne Suppressorzellen. Als Responderzellen wurden in zwei Tests CD4 $^+$, in zwei Tests MNC von Spender A verwendet.

Hierzu wurden entweder MNC oder aufgereinigte CD4 $^+$ Zellen eines Spenders A (Responderzellen) mit reifen DC eines Spenders B (Stimulatorzellen) im Verhältnis 5 : 1 eingesetzt und eine ansteigende Menge DN T-Zellen des Spenders A (Suppressorzellen) zugegeben. Die Proliferation wurde mittels ^3H -Thymidin-Einbau in die Zellen ermittelt.

Wie in Abb. 21 zu erkennen ist (Mittelwerte aus 4 Proliferationstests), ist der inhibitorische Effekt der DN T-Zellen gering (bis 25% Inhibition beim Verhältnis 0,25 : 1). Bei den höheren Verhältnissen 0,5 : 1 und 1 : 1 wurde außerdem ein erneuter Anstieg im Einbau von ^3H -Thymidin beobachtet. Dies spricht am ehesten dafür, dass der suppressive Effekt der DN T-Zellen durch ihre Eigenproliferation überlagert wird. Ein Grund für die geringen Suppressionseffekte ist mit Sicherheit, dass die Immunreaktion dieser primären MLR nicht stark war und nur wenige supprimierbare Spender B-spezifische T-Zellen vorhanden waren.

4.1.5.2 Verlust der Lysekapazität von alloreaktiven Zellen durch DN T-Zellen

Eine indirekte Möglichkeit, die suppressorische Aktivität von DN T-Zellen zu messen besteht in der Inhibition der lytischen Aktivität alloreaktiver T-Zellen (siehe Versuchsaufbau Abb. 22). Responderzellen des Spenders A werden mit Stimulatorzellen des Spenders B für 5 Tage stimuliert. Diese Induktionskultur findet mit oder ohne magnetisch aufgereinigte $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen statt. Die Präsenz spezifischer Zellen wird nun funktionell analysiert, indem man die Responderzellen auf ihre Fähigkeit testet, Zielzellen (PHA-Blasten) von Spender B zu lysieren.

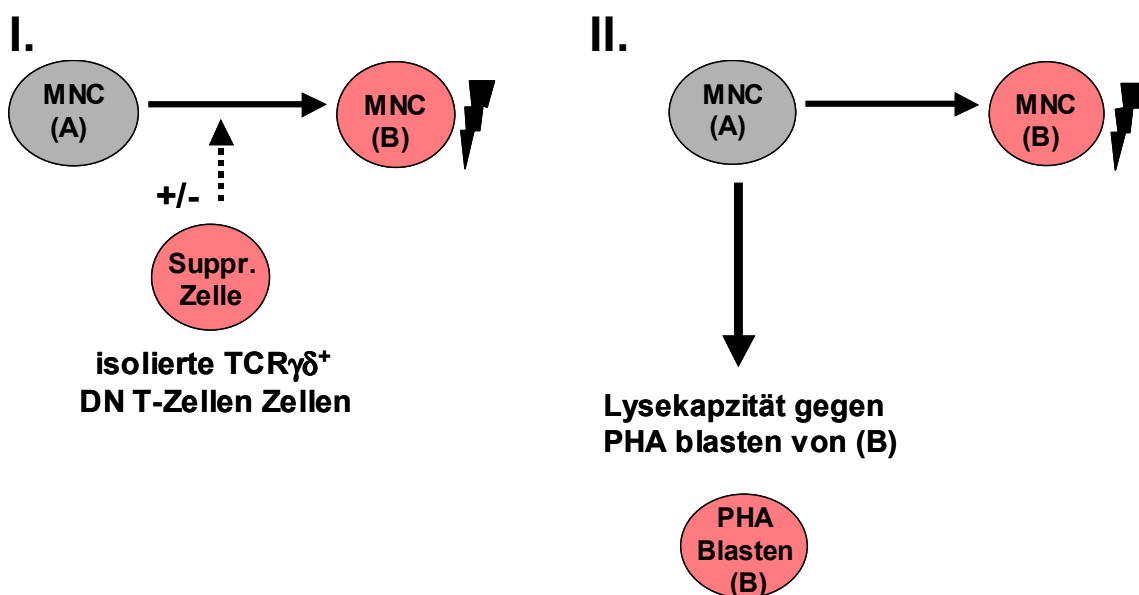


Abb. 22: Versuchsaufbau zur Suppression der Lysekapazität von allo-reaktiven Responderzellen. In einem ersten Schritt (I) sollen alloreaktive Responderzellen von A durch Stimulation mit MNC von Spender B induziert werden. Dabei werden magnetisch isolierte $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen als Suppressorzellen zugegeben. Nach 5 Tagen Kokultur wird in einem zweiten Schritt (II) die Lysekapazität der Responderzellen von Spender A gegen PHA-Blasten von Spender B getestet. Die Stimulatorzellen werden mit 30 Gy bestrahlt, um deren Proliferation zu inhibieren.

Wenn in Anwesenheit von DN T-Suppressorzellen die Aktivierung oder Expansion alloreaktiver T-Zellen und damit die Ausübung der zytolytischen Funktion spezifischer

Responderzellen inhibiert wird, kann eine verminderte PHA-Blasten-Lyse gemessen werden.

Da zytotoxische Responderzellen auch in niedrigen Frequenzen eine effektive Zielzell-Lyse ausüben können, fällt die Suppression einiger weniger Responderzellen stärker ins Gewicht. Dadurch wird eine Art Verstärkung des suppressiven Signals in der Messung erreicht.

In diesem Ansatz kann auch die Spezifität der Suppression untersucht werden. Gemäß der Arbeitshypothese sind die pMHC-Komplexe die Schlüsselstrukturen für die Suppression. Wenn die $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen die Suppression über pMHC-Komplexe vermitteln, so müssten $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen vom "Stimulator-Typ" die besten Suppressoren sein. Der Grund dafür ist, dass die $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen vom Stimulator-Typ natürlicherweise bereits die adäquaten pMHC-Komplexe auf der Oberfläche tragen, gegen welche die T-Zell-Rezeptoren der Responderzellen spezifisch geworden sind. Nur in diesem Fall kann es zu einer Antigen-spezifischen Erkennung zwischen den pMHC-Molekülen auf der Oberfläche der $\text{TCR}\gamma\delta$ DN Suppressorzellen und den spezifischen T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche der Responderzellen kommen (vgl. Modell des Versuchsaufbaus in Abb. 22). Als Suppressorzellen wurden $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen verwendet.

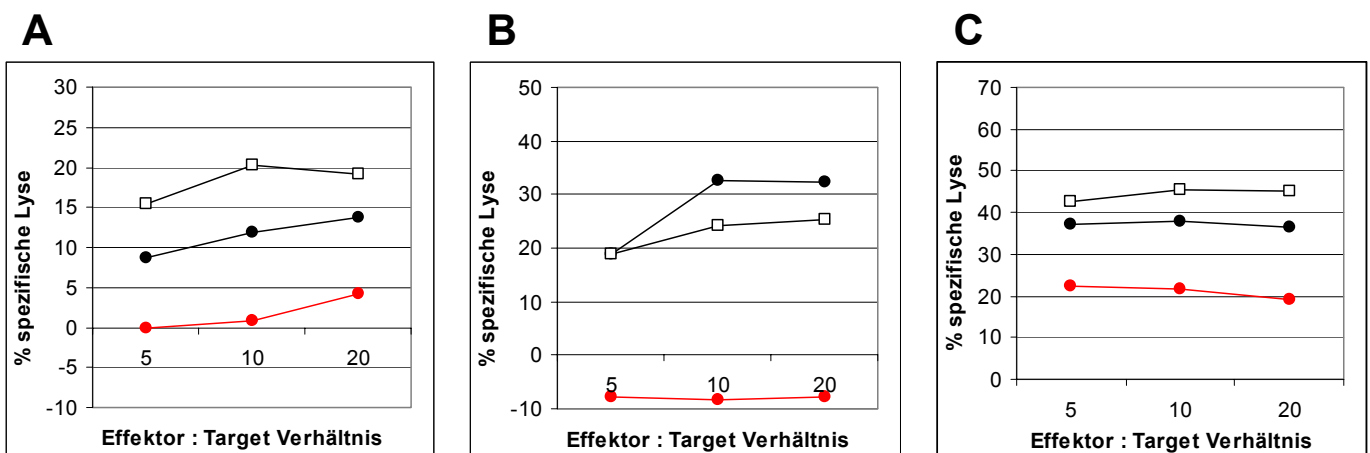


Abb. 23: Inhibition der zytotoxischen Funktion von alloreaktiven T-Zellen durch $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Suppressorzellen. Induktion der Responderzellen ohne die Anwesenheit von Suppressorzellen (schwarze Kreise), mit 1 : 1 $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen (rote Kreise) und mit 1 : 1 Kontroll- $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen eines unverwandten dritten Spenders (offene Kästchen). Die Lysekapazität wurde mit Hilfe von PHA-Blasten vom "Stimulator-Typ" als Zielzellen in einem vierstündigen PKH26-Test analysiert. Gezeigt sind drei unabhängige Experimente (A - C).

Die Lyse von PHA-Blasten Zellen wird im PKH26-Test ermittelt, welcher im Abschnitt 4.2.1.2 (S. 88) näher erläutert ist. Wie in Abb. 23 dargestellt, zeigt sich, dass durch Zugabe von DN Suppressorzellen die zytotoxische Funktion alloreaktiver T-Zellen deutlich inhibiert werden kann (Abb. 23, rote Linien). Im Vergleich dazu kommt es nach Zugabe von DN T-Zellen eines unverwandten dritten Spenders zu keiner Inhibition (Abb. 23, offene Kästchen). Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass der

Verwandtschaftsgrad zwischen den $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN Suppressorzellen und den Responderzellen entscheidend für die Suppressorfunktion dieser Zellen ist. In zwei Experimenten war die lytische Kapazität der Responderzellen unter Zugabe von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DNT -Zellen des unverwandten, dritten Spenders sogar höher als im Kontrollansatz (Abb. 23 A und C).

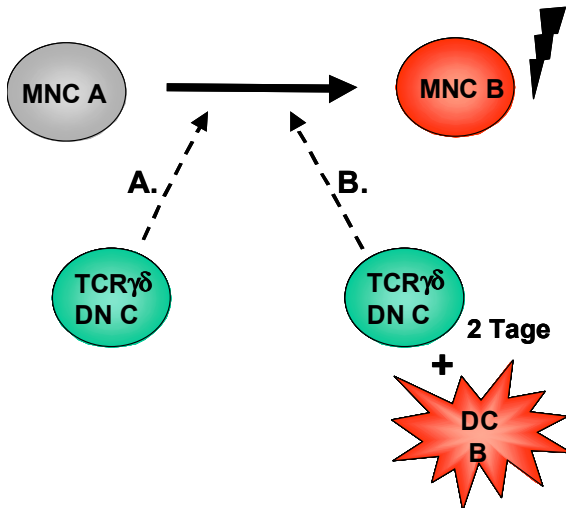


Abb. 24: Schematischer Versuchsaufbau.

MNC von Spender A werden in einer primären MLR mit MNC von Spender B, die mit 30 Gy bestrahlt worden sind, stimuliert. Als Suppressorzellen dienen entweder $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen eines unverwandten, dritten Spenders C (**A**) oder $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen des Spenders C nach einer zweitägigen Konditionierungskultur mit reifen dendritischen Zellen (DC) von Spender B (**B**). Nach der Konditionierungskultur werden die $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen des Spenders C durch Fluoreszenzsortierung isoliert.

In der nächsten Versuchsserie wurde untersucht, ob $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen von unverwandten, dritten Spendern, welche unter normalen Bedingungen nicht suppressorisch aktiv sind (vgl. Abb. 23), die Suppressorfähigkeit erwerben können. Dafür wurden die DN T-Zellen für zwei Tage konditioniert mit reifen DC vom Stimulator-Typ. Während der zweitägigen Konditionierungskultur der $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen von Spender C (siehe Abb. 24) sollte ein Transfer von pMHC-Komplexen auf DN T-Zellen stattfinden. In Abb. 25 sind die Resultate zweier unabhängiger Experimente dargestellt. Die beiden Experimente unterscheiden sich in der Generierung der Spender-B-spezifischen Responderzellen: In einem Experiment wurden allo-reaktiven Responderzellen durch dreimalige, einwöchige Restimulation mit MNC von Spender B generiert und die Suppressorzellen in einer Kurzzeitkultur von 18 h zu den Responderzellen gegeben. In einem zweiten Experiment wurden frische MNC als Responderzellen eingesetzt und die Suppressor DN T-Zellen blieben während der primären MLR von fünf Tagen permanent anwesend. Das Suppressor : Responder Verhältnis betrug in beiden Tests 1,5 : 1. Die zytotoxische Aktivität der Responderzellen wurde anhand der Lyse von PHA-Blasten vom Stimulator-Typ ausgelesen.

Die Resultate beider Experimente waren vergleichbar und sind in Abb. 25 dargestellt: Frisch aufgereinigte DN T-Zellen eines unverwandten, dritten Spenders C können die MLR nicht inhibieren (Abb. 25, dunkelblaue Säulen). DN T-Zellen des Spenders C nach einer Kokultur mit reifen DC vom Stimulator-Typ in der Lage inhibieren jedoch die zytotoxische Funktion der Responderzellen um etwa 40% (Abb. 25, rote Säulen).

Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit den Daten zum pMHC-Transfer, wonach reife dendritische Zellen einen Transfer von pMHC-Molekülen vermitteln können (Abb. 14) und außerdem die transferierten pMHC-Komplexe funktionell sind (vgl. Abb. 19). Die erhobenen Daten sprechen dafür, dass ein Transfer von pMHC-Komplexen auf DN T-Zellen eines unverwandten dritten Spenders zu einer Veto-Aktivität gegenüber allospezifischen Responderzellen befähigt. Die Konditionierungsdauer von zwei Tagen wurde gewählt, um einerseits einen Transfer einer großen Zahl von pMHC-Komplexen zu gewährleisten (siehe Abb. 11), und andererseits die Suppressorzellen nicht durch eine zu lange Kulturdauer zu belasten.

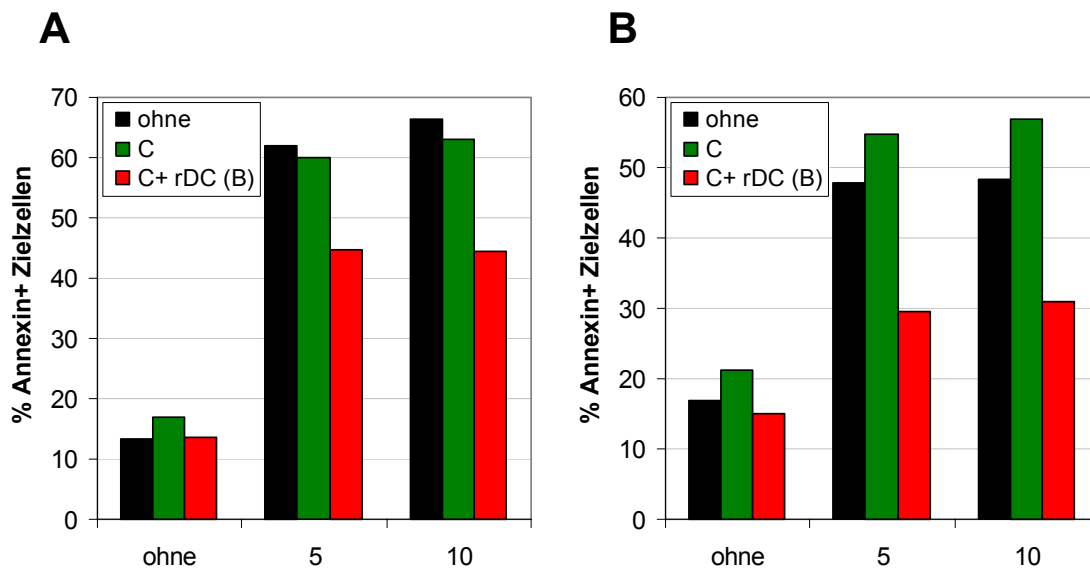


Abb. 25: Eine Vorkultur von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen mit pMHC-Donorzellen (DC) des Spenders B befähigt diese zur Suppression. $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen eines unverwandten, dritten Spenders C (grüne Säulen) sind nicht in der Lage, die zytotoxische Funktion von Responderzellen zu inhibieren. Die lytische Funktion der Responderzellen (schwarze Säulen, ohne Suppressorzellen) wird jedoch effektiv supprimiert durch die Zugabe von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen, die für zwei Tage konditioniert wurden mit reifen, dendritischen Zellen (rDC) vom Stimulator-Typ B (rote Säulen). Gezeigt sind zwei unabhängige Experimente (A) und (B) mit verschiedenen Spendern.

4.1.6 Apoptose-Induktion von Antigen-spezifischen T-Zellen im autologen System

4.1.6.1 Testsystem

Der folgende Abschnitt befasst sich mit dem Nachweis der Antigen-spezifischen Suppression durch $\text{TCR}\alpha\beta^+$ und $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen im autologen System. Das Testsystem für die Antigen-spezifische Suppression ist in Abb. 26 schematisch dargestellt: Mit Hilfe von definierten Peptiden wurden Antigen-spezifische T-Zell-Linien von verschiedenen gesunden Spendern generiert (Abb. 26 A). Die Frequenz der darin enthaltenen spezifischen T-Zellen wurde mittels pMHC-Tetrameren quantifiziert. Für die

Versuche wurde überwiegend ein modifiziertes HLA-A2-bindendes Melan-A-Peptid (ELAGIGILTV statt dem Wildtyp-Peptid EAAGIGILTV) verwendet. Melan-A ist ein Selbstantigen unbekannter Funktion, welches auf Melanozyten und malignen Melanomen exprimiert wird. Im Vorfeld wurden *in vitro* Melan-A-spezifische T-Zellen generiert. Dafür wurden CD8⁺ Zellen eines gesunden Spenders magnetisch angereichert und einmal wöchentlich mit autologen, Melan-A-beladenen, reifen DC restimuliert. Die Melan-A-spezifischen T-Zellen expandierten auf diesen wiederholten Stimulus stark und entwickelten sich zu zytotoxischen T-Zellen (CTL, vgl. z.B. Abb. 27 A). Nach drei- bis viermaliger Stimulation enthalten die T-Zell-Kulturen einen hohen Anteil (ca. 50-80%) spezifischer T-Zellen [192]. Die CTL wurden zwischen der dritten und der sechsten Stimulation verwendet. Die wöchentliche Restimulation lag jeweils mindestens 4 Tage zurück.

Einen Tag vor dem Suppressionstest wurden autologe DN T-Zellen gewonnen. Dafür wurde die PBL-Fraktion des Spenders aufgetaut und daraus DN T-Zellen über magnetische Voraufreinigung/ Fluoreszenzsortierung (siehe Abschnitt 4.1.2.1.) gewonnen. Alternativ zu einer Aufreinigung kamen DN T-Zell-Klone, welche von verschiedenen HLA-A2-positiven Spendern generiert wurden, zum Einsatz (siehe Abschnitt 4.1.2.2). Die reinen DN T-Zellen wurden nun in einer etwa 20-stündigen Konditionierungskultur bei 37 °C mit Melan-A-beladenen, reifen autologen DC inkubiert (Abb. 26 B).

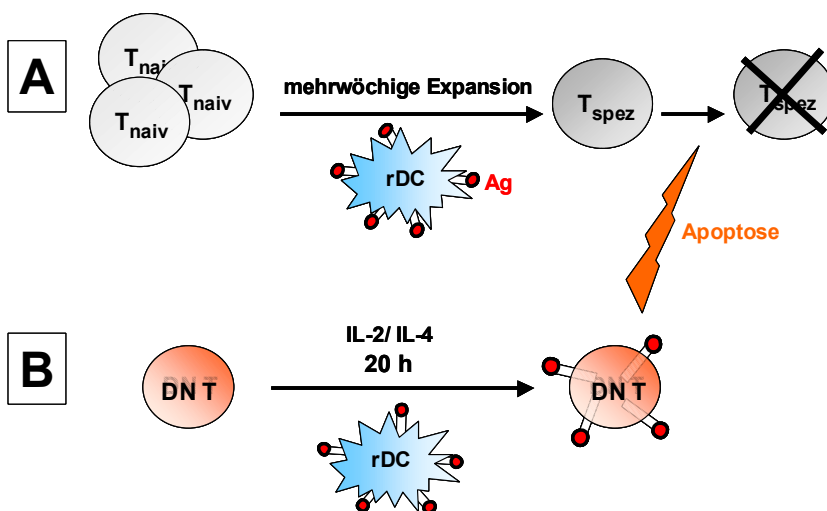


Abb. 26: Testsystem für die Antigen-spezifische Suppressorfunktion von DN T-Zellen. (A) Antigen-spezifische T-Zell-Linien werden generiert durch repetitive Stimulation von CD8⁺ T-Lymphozyten (CTL) mit reifen, Antigen (Ag)-beladenen dendritischen Zellen (rDC). (B) DN T-Zellen werden in einer Konditionierungskultur mit Antigen-beladenen rDCs zu Suppressorzellen konditioniert. In einem Apoptose-Test wird die Apoptose-Induktion in Antigen-spezifischen CTL durch konditionierte DN T-Zellen ermittelt. Analysiert wurde dabei der Anteil spezifischer T-Zellen innerhalb der CTL und die Apoptose mittels AnnexinV-Färbung.

Als Read-out-System wurde die Fähigkeit der DN T-Zellen, Apoptose in den Antigen-spezifischen CTL zu induzieren, untersucht. Hierfür wurden die CTL (Zielzellen) zusammen mit den konditionierten Suppressorzellen (Effektorzellen) für 4h inkubiert (Abb. 26). Anschließend wurde eine Melan-A-MHC-Tetramerfärbung zur Detektion Antigen-spezifischer CTL durchgeführt; direkt im Anschluss wurden die

Oberflächenmarker CD8 und TCR $\gamma\delta$ (nur für TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zell-Klone) gefärbt. Zuletzt wurde eine Färbung mit AnnexinV durchgeführt, um die apoptotischen Zellen zu identifizieren. Die gewählte Kanalbelegung am Durchflusszytometer ist in Tab. 1) dargestellt. Dabei war der dritte Kanal bei sortierten Zellen automatisch durch die Reste von gebundenem PC-5-konjugiertem Antikörper belegt, welche die Zellen für die Fluoreszenzsortierung positiv markierte.

	Färbung	dargestellter Parameter
1. Kanal	AnnexinV-FITC	Apoptose
2. Kanal	Melan-A-MHC-Tetramer-PE	Antigenspezifität
3. Kanal	TCR $\gamma\delta$ -Cychrome oder CD3 Cychrome (Rest von der Zellsortierung)	DN T-Zellen = Effektorzellen
4. Kanal	CD8 APC	CTL = Zielzellen

Tab. 1: Kanalbelegung des Apoptose-Tests im autologen Testsystem

4.1.6.2 Antigen-spezifische Deletion von CD8⁺ CTL

Der in Abb. 26 geschilderte Versuchsaufbau diente dem Nachweis der Deletion Antigen-spezifischer T-Zellen durch DN T-Zellen. Die CD8⁺ Melan-A-spezifischen CTL wurden als Zielzellen verwendet und mit ansteigenden Mengen konditionierter DN T-Zellen für 4 h kokultiviert. Im Anschluss daran wurde die frühe Apoptose mittels AnnexinV-Färbung ermittelt. In Abb. 27 ist das Resultat eines repräsentativen Experimentes dargestellt: In diesen Dotplots werden alle CD8⁺ Zellen angezeigt, wodurch die DN T-Suppressorzellen ausgegated werden.

Die auffällige Punktwolke im linken, oberen Quadranten (Annexin⁻/Tetramer⁺) stellt die vitalen, Melan-A-spezifischen CD8⁺ CTL dar. Diese Zellen wanderten unter dem Einfluss der konditionierten DN T-Zellen bei ansteigendem DN T-Zell : CTL Verhältnis in die Annexin⁺ Quadranten ab (siehe Abb. 27 B, linke Spalte). Wenn im Gegensatz dazu die DN T-Zellen mit Kontroll-Peptid (gp100)-beladenen DC konditioniert worden waren, kam es zu keiner erhöhten Apoptose-Induktion von Melan-A-spezifischen CTL (siehe Abb. 27 B, rechte Spalte und zusammengefasst in Abb. 27 C). Daraus wird ersichtlich, dass die Vorbehandlung der DN T-Zellen auch in diesem Versuch eine wesentliche Voraussetzung für deren Suppressorfunktion war, was auch schon aus den Versuchen im allogenen System (Abschnitt 4.1.5.2) hervorging.

Auffällig ist, dass die CTL, welche unter dem Einfluss der DN T-Zellen apoptotisch werden, nicht nur nach rechts (Richtung Annexin⁺) wanderten, sondern zugleich nach unten (Richtung Tetramer⁻). Dies bedeutet, dass die Zellen für das Tetramer nicht mehr anfärbbar sind, weil der TCR an der Zelloberfläche nicht mehr vorhanden ist. Die Internalisierung des TCR nach spezifischer Antigen-Erkennung ist bekannt [193] und

weist ebenfalls darauf hin, dass es sich bei den hier beobachteten Effekten um eine spezifische Form der Suppression handelt.

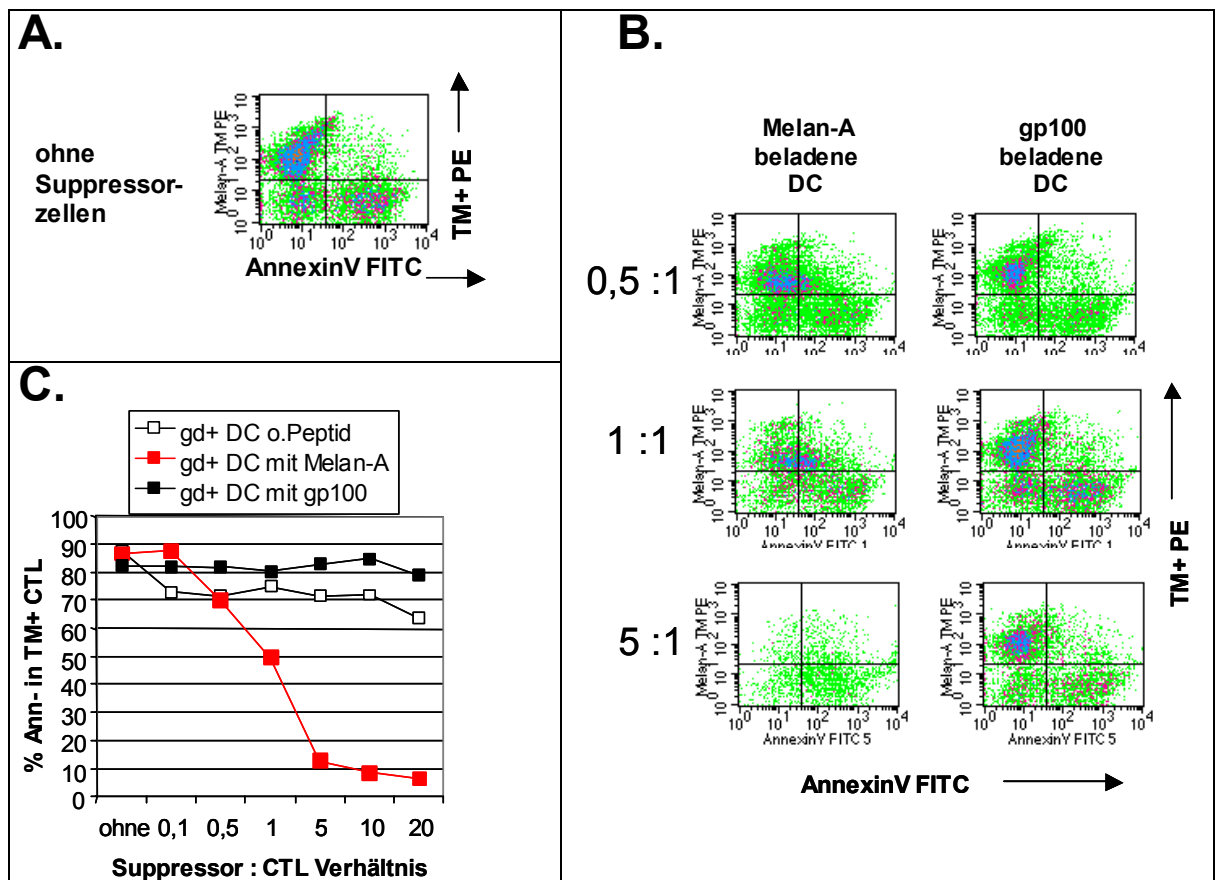


Abb. 27: Apoptose-Induktion durch konditionierte autologe TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zellen. (A) Darstellung der Ausgangspopulation Melan-A-spezifischer CTL (ohne Suppressorzellen). 65 % der Zellen liegen im oberen linken Quadranten und sind Tetramer-PE⁺/Annexin⁻. (B) **Linke Spalte:** Bei Zugabe von ansteigenden Mengen DN Suppressorzellen, die mit Melan-A-beladenen rDC konditioniert wurden, wandern die CTL in die rechten Quadranten und werden Annexin⁺. (B) **Rechte Spalte:** Im Gegensatz dazu werden die Melan-A-spezifischen CTL bei Kokultur mit Suppressorzellen, welche mit gp100-beladenen DC konditioniert wurden, nicht apoptotisch und verbleiben im linken oberen Quadranten. In den abgebildeten Dotplots wurde bei den hohen Suppressor: CTL Verhältnissen eine niedrigere Absolut-Zellzahl aufgezeichnet. (C) In einer Gesamtdarstellung vitaler TM⁺/Annexin⁻ CTL zeigt sich, dass die Konditionierung von DN T-Zellen mit den DC für die Apoptose-Induktion in vitalen CTL ausschlaggebend ist. In allen abgebildeten Dotplots wurde auf die CD8⁺ Zielzellen gated.

Die Internalisierung des TCR bei Antigen-spezifischer Suppression erschwert die Ermittlung der Tetramer⁺ CTL bei der Auswertung. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Melan-A-MHC-Tetramer-Färbung bereits *vor* der Koinkubation mit den Suppressorzellen durchgeführt (vergleiche Abb. 28, Melan-A VOR, Melan-A NACH). Als Kontroll-Suppressorzellen dienten in diesem Ansatz DN T-Zellen, welche mit EBV-Peptid-beladenen DC konditioniert wurden (Abb. 28).

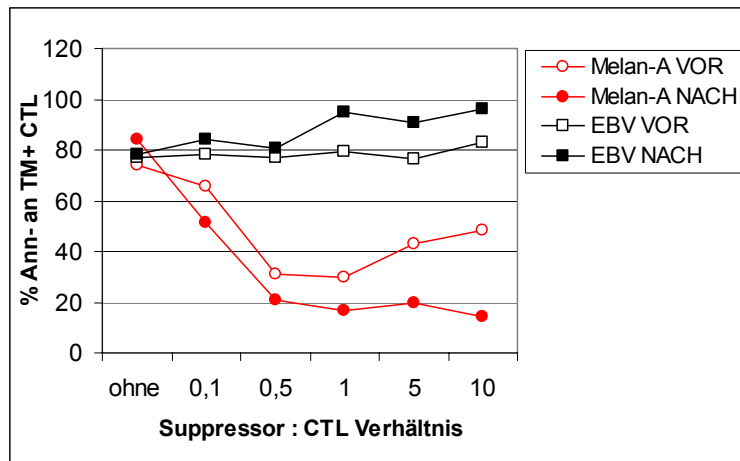
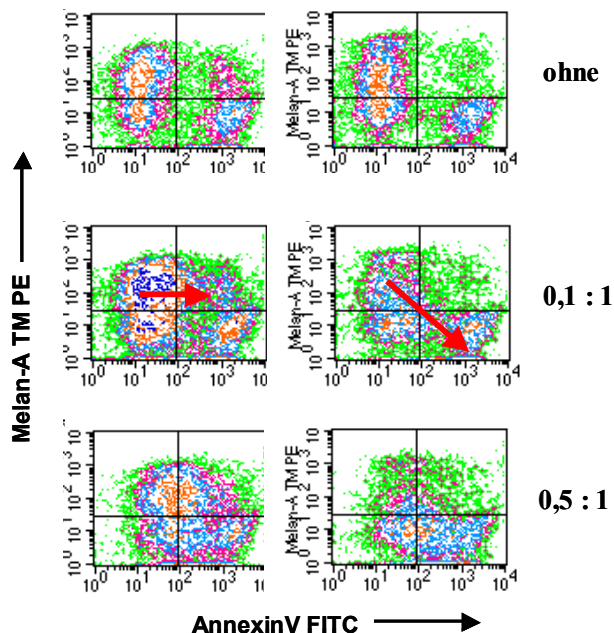
A.**B.****TM vorher****TM nachher**

Abb. 28:

Vergleich zwischen den beiden Verfahren, die Melan-A-MHC-Tetramerfärbung *vor* (offene Symbole) oder *nach* (geschlossene Symbole) der Kokultur mit den Suppressorzellen durchzuführen. **(A)** Als Suppressorzellen wurde der TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zell-Klon 2B6 eingesetzt, welcher mit Melan-A-beladenen DC (rote Kreise) oder EBV-beladenen DC (schwarze Kästchen) konditioniert wurde. Der Apoptose-induzierende Effekt der Suppressorzellen wird durch die vor dem Test durchgeführte Melan-A-MHC-Tetramer-Färbung inhibiert. Die Originalplots des Ansatzes mit Melan-A sind in **(B)** dargestellt: Die Punktwolke der TM⁺ Annexin⁻ Zellen wandert bei Färbung der Zellen *vor* dem Test (linke Spalte) ausschließlich nach rechts. Bei einer Färbung *nach* dem Test wandert die Wolke nach rechts unten aufgrund der Internalisierung des TCR (rechte Spalte). Es ist zu sehen, dass der Apoptoseeffekt bei der Färbung vor dem Test abgemildert ist: Die Punktwolke verschiebt sich nur leicht nach rechts. Die Originalplots zeigen die Messpunkte dichtekodiert.

Die Suppressor: CTL Verhältnisse sind am rechten Rand angegeben.

Ein Vergleich beider Verfahren zeigte, dass die Internalisierung der TCR zwar größtenteils verhindert werden kann (Abb. 28), dass die p-MHC-Tetramere jedoch mit der supprimierenden Funktion der DN T-Zellen interferieren und den Apoptose-induzierenden Effekt inhibieren (siehe Abb. 28 A und B).

Da eine separate Auswertung der spezifischen und der unspezifischen Apoptose in CTL für die Untersuchung der bearbeiteten Fragestellung von großem Interesse ist, wurde dieses Problem durch einen anderen Auswertemodus gelöst. Es wird nicht die Zunahme der TM⁺ Annexin⁺ Zellen ermittelt, sondern die Abnahme der vitalen Zellen an den gesamten TM⁺ Zellen. Die TM⁺ Zellen werden rechnerisch anhand des Kontrollansatzes ermittelt. Das exakte Berechnungsschema ist im Anhang unter 6.1.1. ausgeführt. Dieses Berechnungsschema wurde auch für die Auswertung der Tests in Abb. 27 C und Abb. 28 A verwendet.

In Abb. 29 ist ein Experiment mit Melan-A-spezifischen CTL eines anderen Spenders gezeigt. Die $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen wurden mit unterschiedlich beladenen, autologen DC konditioniert (Abb. 29, siehe Legende). Eine starke Abnahme der vitalen TM^+ Annexin $^-$ Zellen ist nur dann zu verzeichnen, wenn die Suppressorzellen mit Melan-A-beladenen, reifen DC konditioniert wurden (Abb. 29 A).

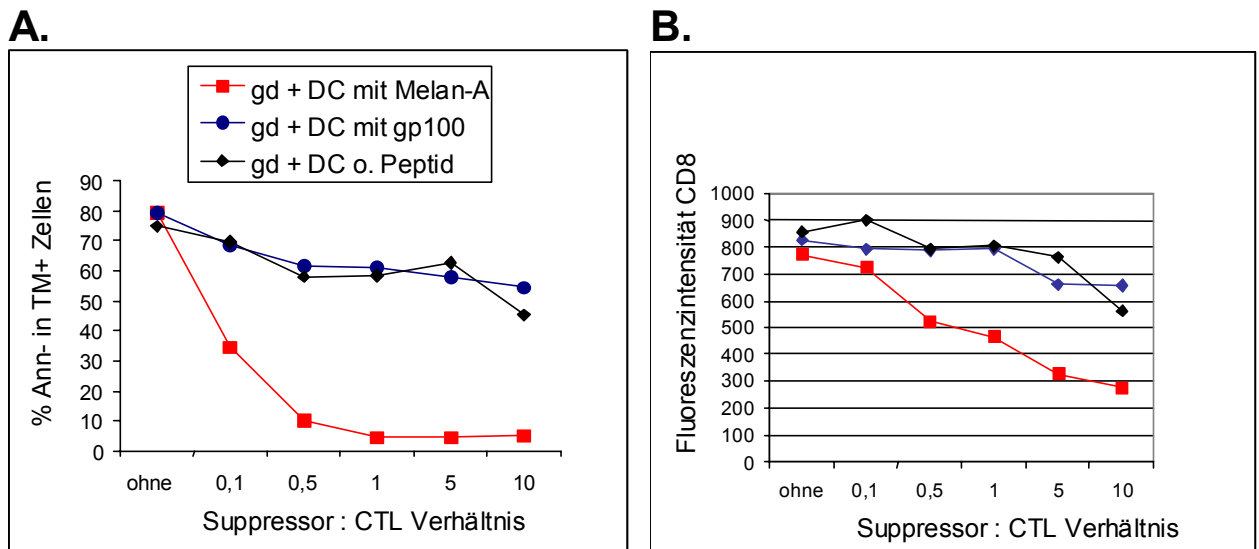


Abb. 29: Abnahme der CD8-Fluoreszenzintensität der CTL im Apoptose-Test ist Antigen-spezifisch. **(A)** Ermittlung der Annexin $^-$ CTL innerhalb der TM^+ CTL. Die Zellen wurden zuvor mit konditionierten $\text{TCR}\gamma\delta^+$ Suppressor-DN T-Zellen kokultiviert. Die Art der Vorkultur der $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen ist in der Legende dargestellt. **(B)** Auswertung der CD8-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des Suppressor : CTL Verhältnisses des Suppressionstest von (A).

Außerdem zeigt die Auswertung der CD8-Fluoreszenzintensität für die CTL, dass diese mit zunehmendem Suppressor : CTL Verhältnis abnimmt (Abb. 29 B). Dies bedeutet, dass es vor allem zu einer Zunahme von CD8^{low} T-Zellen innerhalb der CTL Population kommt, was als ein Zeichen von Apoptose gewertet werden kann (unveröffentlichte Daten, Prof. Mackensen, Universitätsklinikum Regensburg). Diese Abnahme der CD8-Fluoreszenzintensität ist nur im Ansatz mit Melan-A-beladenen DC zu verzeichnen, kaum jedoch im Ansatz mit DC ohne Peptidbeladung oder irrelevanter Peptidbeladung (gp100, Abb. 29 B) und ein weiterer Hinweis darauf, dass die Antigen-spezifischen CTL nach Kontakt mit adäquat konditionierten DN T-Zellen apoptotisch werden.

Eine Frage, die zuvor bereits angesprochen wurde, ist, ob auch die unspezifischen CTL von den konditionierten DN T-Zellen im Apoptose-Test eliminiert werden. Diese Zellen liegen in den Dotplots im unteren, linken Quadranten (vgl. Abb. 27). Diese Frage kann beantwortet werden, indem der Anteil vitaler, unspezifischer (TM^-/Ann^-) an den gesamten TM^- nach demselben Schema wie für die spezifischen CTL, berechnet wird. Hierbei ergibt sich folgendes Bild (Abb. 30): Der Anteil der unspezifischen TM^- Zellen in den CTL-Kulturen (ohne Suppressorzellen) liegt bei etwa 30 - 40% (siehe Abb. 30). Nach Zugabe einer ansteigenden Menge von Suppressor DN T-Zellen nimmt die Zahl der Annexin $^-$ Zellen im Vergleich zu den spezifischen CTL (vgl. Abb. 27 und 29) nicht ab. Die TM^- CTL

werden von den DN T-Zellen nicht supprimiert. Die Kurven für die verschieden konditionierten DN T-Zellen liegen übereinander.

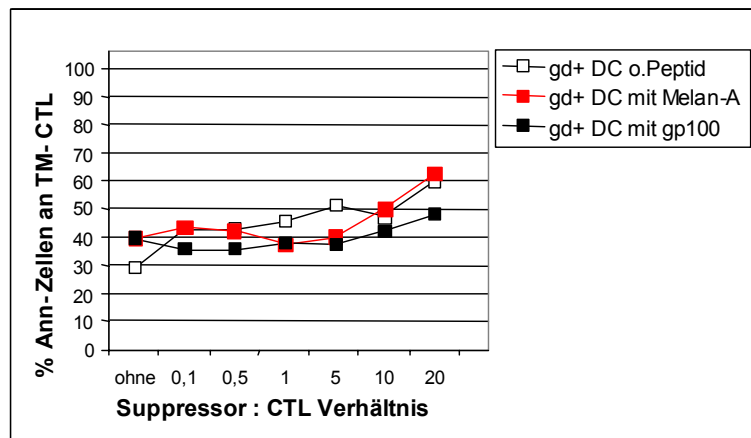


Abb. 30:

Darstellung der Apoptose-Induktion in den unspezifischen (TM-negativen) CTL im Apoptose-Test mit konditionierten $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen. Die Bedingungen der Konditionierungskultur für die DN T-Zellen sind in der Legende angegeben. In die Auswertung wurden nur CD8^+ Zellen eingeschlossen. Die Auswertung erfolgte nach dem selben Berechnungsschema wie für die TM^+ Zellen (s. Anhang unter 6.1.1.). (Die dargestellten Daten zeigt eine Auswertung des Apoptose-Tests von Abb. 27).

Darüber hinaus wurden im Antigen-spezifischen Modell Apoptoseexperimente mit der anderen Subpopulation von DN T-Zellen, den $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zell-Klone generiert und diese in die Konditionierung mit DC und im Anschluss daran in die Suppressionstests eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass auch die $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen Apoptose in Antigen-spezifischen CTL induzieren können (Abb. 31).

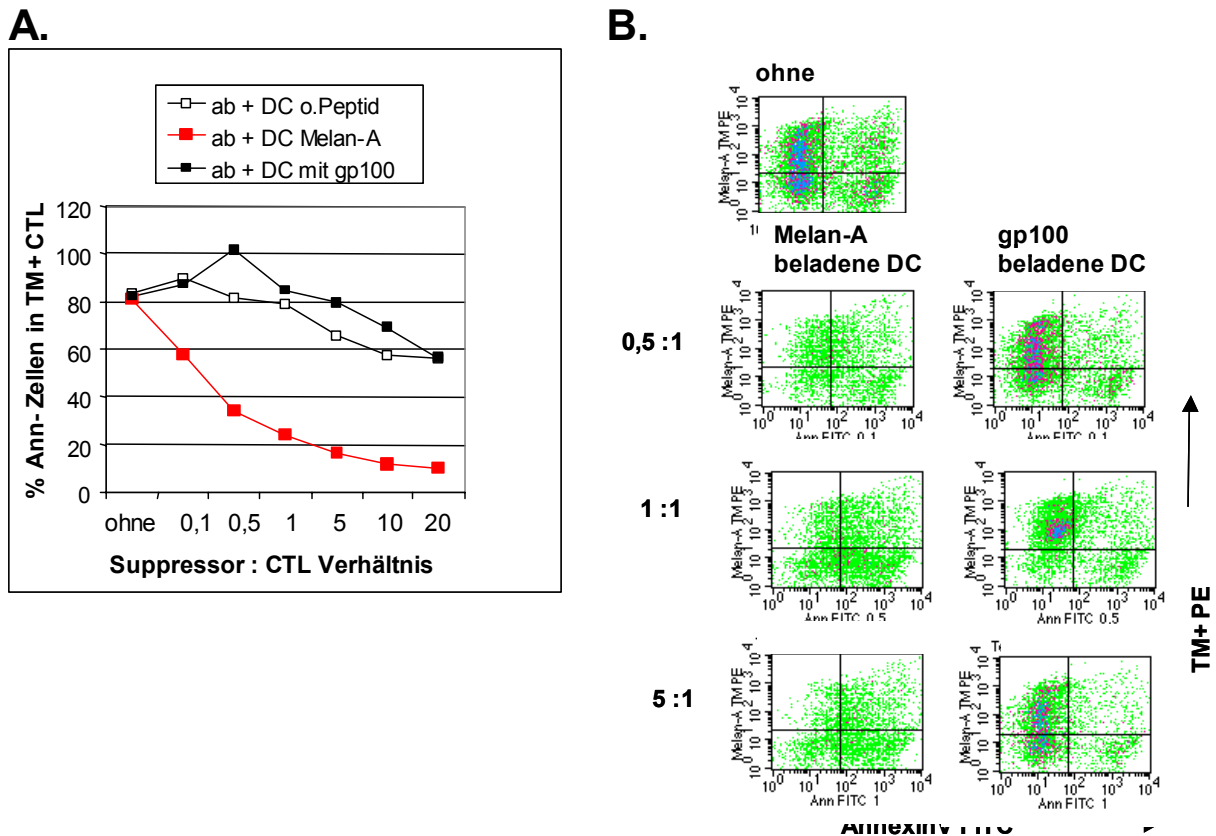


Abb. 31: Induktion von Apoptose in Antigen-spezifischen CTL durch konditionierte $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen. Autologe Melan-A-spezifische CTL wurden als Zielzellen eingesetzt und mit dem $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zell-Klon 1D6, der zuvor mit Melan-A-beladenen DC konditioniert wurde, kokulturiert. **(A)** Entwicklung des Anteils Ann⁻ Zellen innerhalb der TM⁺ CTL in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge Suppressorzellen im Apoptose-Test. Die Bedingungen der Konditionierungskultur des $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zell-Klons sind in der Legende dargestellt. **(B)** Originalplots des Tests von (A). **Linke Spalte:** oben: Kontrollansatz ohne Suppressorzellen; unten: 1D6 Klon konditioniert mit Melan-A-beladenen DC. **Rechte Spalte:** 1D6 Klon konditioniert mit gp100-beladenen DC. In allen Dotplots sind nur die CD8^+ CTL angezeigt.

4.1.6.3 Zytokinproduktion während der Antigen-spezifischen Suppression

Es wurde ferner untersucht, welche Zytokine während eines autologen Apoptose-Tests sezerniert werden. Hierfür wurde nach der vierstündigen Kokultur von DN T-Zellen mit CTL als Zielzellen der Überstand abgeerntet und auf seinen Gehalt an Zytokinen überprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 32 dargestellt.

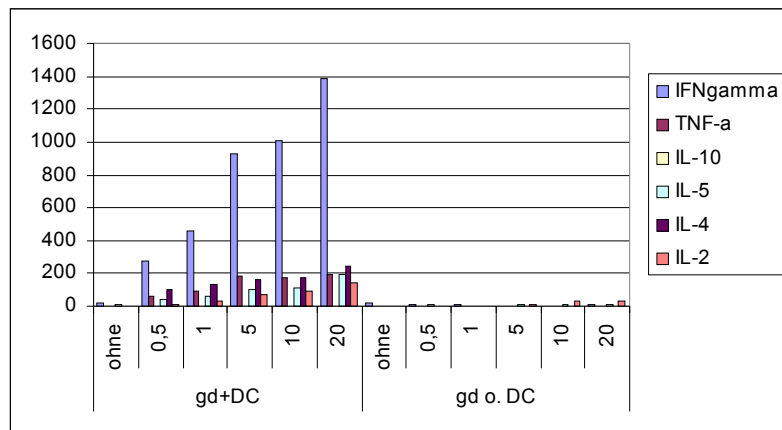
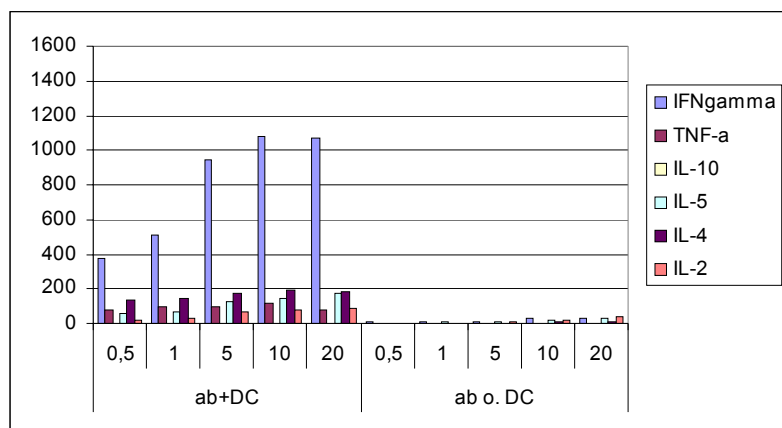
A.**B.**

Abb. 32: Analyse der Zytokinproduktion während eines Antigen-spezifischen Apoptose-Tests. Auf der linken Seite der Diagramme befinden sich jeweils DN T-Zellen, welche mit Melan-A-beladenen DC konditioniert wurden. Auf der rechten Seite wurden die DN T-Zelle ohne DC konditioniert. **(A)** Suppressorzellen: Fluoreszenzsortierte $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen. **(B)** Suppressorzellen: 1D1 $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zell-Klon. Als Zielzellen wurden Melan-A-spezifische CTL verwendet.

4.1.6.4 Kinetik der Antigen-spezifischen Suppression und AnnexinV-Bindung

Die Apoptose-Induktion durch $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen in CD8^+ CTL ist ein sehr rascher Prozess, der sich innerhalb weniger Stunden vollzieht. Es wurde nun untersucht, wie sich der Effekt nach einer längeren Inkubationsdauer verhält. Hierfür wurde ein Apoptose-Test mit $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen, die mit und ohne Melan-A-beladenen DC konditioniert wurden, durchgeführt. Der erste Teil des Tests wurde nach 4 h, der zweite nach insgesamt 13 h abgeerntet (siehe Abb. 33). Nach 4 h kann man eine Abnahme der AnnexinV-Zellen innerhalb der TM^+ CTL verzeichnen. Eine weitere Inkubation des Apoptose-Tests für insgesamt 13 h bringt keine weitere Abnahme der vitalen Zellen und somit keine Verbesserung in der Detektion des Suppressionseffektes (Abb. 33, rote Linien). Bei den Suppressor : CTL Verhältnissen von 0,5 : 1 und 1 : 1 konnten nach 13 h teilweise mehr

vitale Ann⁻ CTL im Vergleich zum Wert nach 4 h detektiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass der Apoptoseprozess in den angegriffenen CTL nach 13 h bereits vollzogen ist und diese Zellen aus dem CD8⁺-Gate in den Bereich toter Zellen (niedriger FSC/SSC im Durchflusszytometer) übergegangen sind.

In den Kontrollansätzen, in welchen die TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zellen ohne DC in der Konditionierungskultur gehalten wurden und sich keine Suppression zeigt, kann man einen Anstieg der Annexin⁻ Zellen (Abb. 33, schwarze Linien) beobachten. Dieser Effekt wurde in mehreren Tests beobachtet. Nach einer Testdauer von 13 h hat sich dieser Effekt noch weiter verstärkt (Abb. 33, offene Kästchen). Diese scheinbare Zunahme vitaler (Ann⁻) Zellen kann darauf zurückgehen, dass DN T-Zellen durch einen konstitutiv sezernierten Faktor die Apoptose von T-Zellen, welche während einer 13-stündigen Inkubationszeit in T-Zell-Medium einer vermehrten Apoptose unterliegen, verhindern. Um derartige Langzeiteffekte zu verhindern, ist eine Inkubationszeit von 4 h im Suppressionstest für die Untersuchungen optimal.

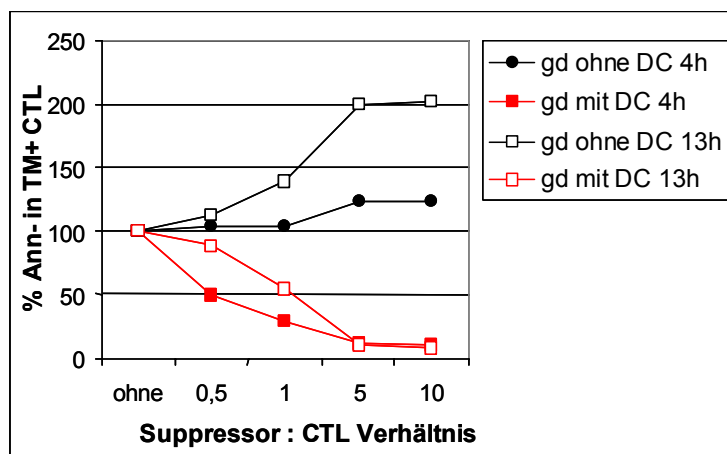


Abb. 33: Einfluss der Inkubationszeit auf die detektierte Apoptose im Suppressionstest. Apoptose-Test mit sortierten, konditionierten TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zellen (gd) als Suppressorzellen und Melan-A-spezifischen CTL als Zielzellen. Die TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zellen wurden konditioniert mit Melan-A- beladenen DC (rot) oder ohne Melan-A- beladene DC (Negativkontrolle, schwarz). Der Apoptose-Test wurde für 4 h oder für 13 h bei 37 °C inkubiert. Dargestellt sind die vitalen Ann⁻ anteilig an den TM⁺ CTL normiert auf den Kontrollansatz (ohne Suppressorzellen) in Abhängigkeit vom Suppressor : CTL Verhältnis.

Ein weiteres Argument für eine Inkubationszeit im Apoptose-Test von 4 h ist, dass nach 4 h der Zielzell-Schaden gut mit der AnnexinV-Bindung korreliert. Diese Korrelation wurde für die lytische Aktivität zytotoxischer T-Zellen systematisch untersucht im Rahmen der Etablierung des PKH26-Tests. Der Zellschaden in den Zielzellen korreliert in den den ersten drei Stunden des Kontakts zwischen Effektor- und Zielzellen am besten mit der AnnexinV-Bindung, wie in parallelen PKH26 Tests und ⁵¹Cr-Freisetzungstests ermittelt wurde (siehe Abb. 43 A und B).

4.1.6.5 Mechanismus der Antigen-spezifischen Suppression

4.1.6.5.1 Der Perforin/ Granzyme Signalweg

Um der Frage nachzugehen, über welchen Mechanismus DN T-Zellen die Apoptose-Induktion in Antigen-spezifischen CD8⁺ CTL vermitteln, wurden Blockierungsversuche durchgeführt. Hierbei kam zunächst Concanamycin-A (CMA), ein sehr effektiver

Inhibitor der Perforin/ Granzyme-vermittelten Apoptose, zum Einsatz. Die CMA-Behandlung der CTL wurde für 20 h vor dem Test durchgeführt, damit das intrazellulär vorhandene Perforin abgebaut wird. Um die Hochregulation des Perforin-Gehaltes während des Apoptose-Tests zu verhindern, wurde CMA auch während des Tests in der gleichen Konzentration zugegeben.

In einer Positivkontrolle konnte verifiziert werden, dass CMA die Zytolyse von zytotoxischen T-Zellen inhibiert. Hierfür wurden Melan-A-spezifische CTL als Effektorzellen im PKH26-Test gegen Melan-A-beladene, PKH26⁺ T2 Zielzellen eingesetzt. Dabei verzeichnet man eine deutliche Abnahme der Apoptose-Induktion in den Zielzellen bei Verwendung von CMA (Abb. 34 B). Im Gegensatz dazu konnte die Apoptose-Induktion durch DN T-Zellen nicht mit CMA blockiert werden (Abb. 34 A). Diese Resultate beweisen, dass die DN T-Zell-vermittelte Apoptose nicht über den vesikulären Granzyme/Perforin-Signalweg vermittelt wird.

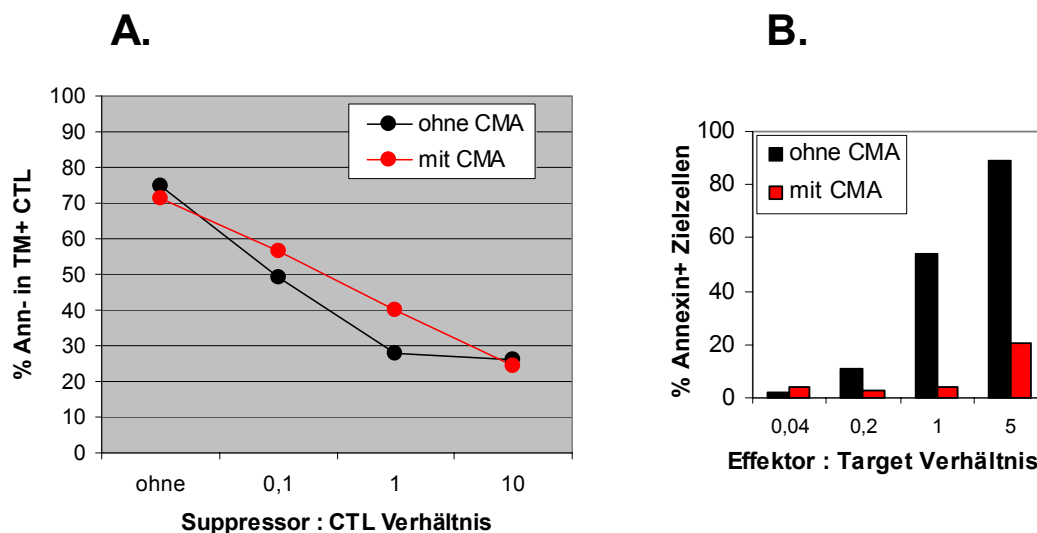


Abb. 34: Blockierungsversuche zur Antigen-spezifischen Apoptose-Induktion in CTL durch DN T-Zellen mit Hilfe von CMA. **(A)** Einsatz von CMA im Apoptose-Test mit dem TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN T-Zell-Klon 1D6. Effektorzellen: Klon 1D6, der mit Melan-A-beladenen DC konditioniert wurde. Zielzellen: Melan-A-spezifische CTL. Schwarze Kreise: ohne CMA; rote Kreise: mit CMA. **(B)**. Positivkontrolle: PKH26-Test, in welchem Melan-A-spezifische CTL mit zunehmendem Effektor : Target Verhältnis Melan-A-beladene T2 Zielzellen lysieren. Die Zielzell-Lyse durch Melan-A-spezifische CTL-Effektorzellen ist durch CMA gut blockierbar.

Weiter wurden Intrazellulärfärbungen von DN T-Zellen mit einem anti-Perforin- und anti-Granzyme-B-Antikörper durchgeführt. Hierfür wurden TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen aus einem buffy coat angereichert. Nach einer 24-stündigen Kokultur mit reifen, allogenen DC wurden die DN T-Zellen für die Analyse verwendet. Nach einer 24-stündigen Kokultur mit reifen DC exprimieren TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen zwar Perforin, sind jedoch negativ für Granzyme-B (Abb. 35 A). Antigen-spezifische CTL hingegen produzieren intrazellulär große Mengen von Perforin und Granzyme-B (Abb. 35 B). Während Perforin konstitutiv auch in naiven T-Zellen produziert werden kann, ist hauptsächlich intrazelluläres Granzyme-B entscheidend für die Lysekapazität von zytotoxischen T-Zellen. Demnach

scheinen $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen, da Granzyme-B fehlt, nicht zur typischen Zielzelllyse durch das Zusammenwirken von Perforin/Granzyme in der Lage zu sein. Eine phänotypische Untersuchung von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen bezüglich Granzyme-B und Perforin wurde noch nicht durchgeführt.

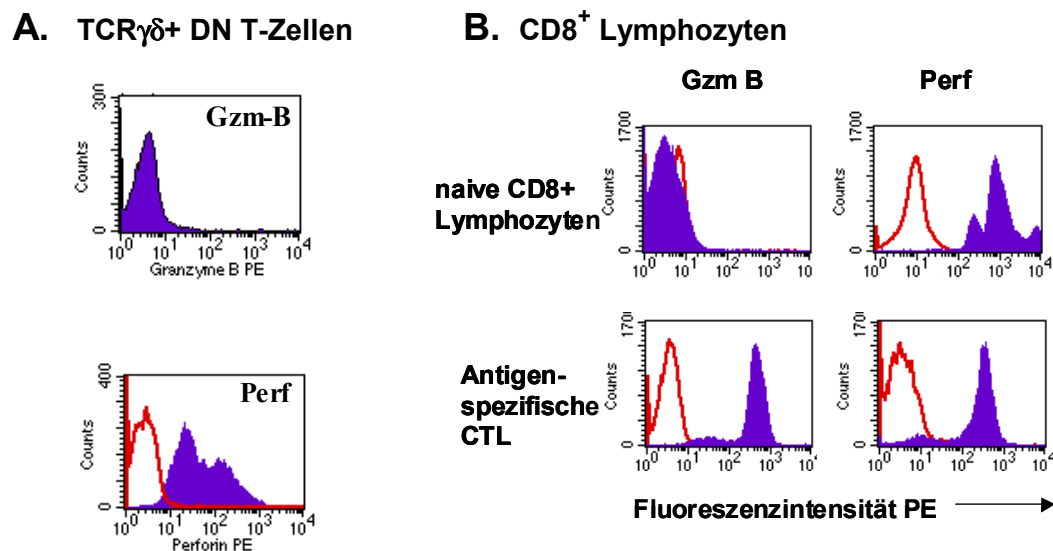


Abb. 35: Intrazellulärfärbungen mit anti-GranzymeB-PE (Gzm) und anti-Perforin-PE (Perf) monoklonalen Antikörpern. (A) Fluoreszenzsortierte $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen nach 24-stündiger Kokultur mit allogenen, reifen DC. (A) Naive T-Lymphozyten bzw. Antigen-spezifische CTL nach dreiwöchiger Stimulation mit autologen, Antigen-beladenen, reifen DC. Rote Histogramme: Isotypkontrolle; Violette, gefüllte Histogramme: Antikörperbindung.

4.1.6.5.2 Der Fas/FasL Signalweg

Wie in der Einleitung ausgeführt, ist das Rezeptorpaar Fas/FasL in eine Reihe apoptotischer Prozesse involviert, und wird allgemein als Hauptsignalweg des AICD angesehen. Um zu untersuchen, ob der Fas/FasL Signalweg eine Rolle spielt bei der Apoptose-Induktion in Antigen-spezifischen CTL durch DN T-Zellen, wurde das Oberflächenmolekül Fas im Apoptose-Test blockiert. CD8^+ CTL wurden, bevor sie als Zielzellen im Apoptose-Test eingesetzt wurden, mit $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ eines blockierenden monoklonalen anti-Fas-Antikörpers (Klon ZH-4) inkubiert. Durch die Bindung des Antikörpers an die CTL soll die mögliche Apoptose-Induktion durch FasLigand im Apoptose-Test inhibiert werden.

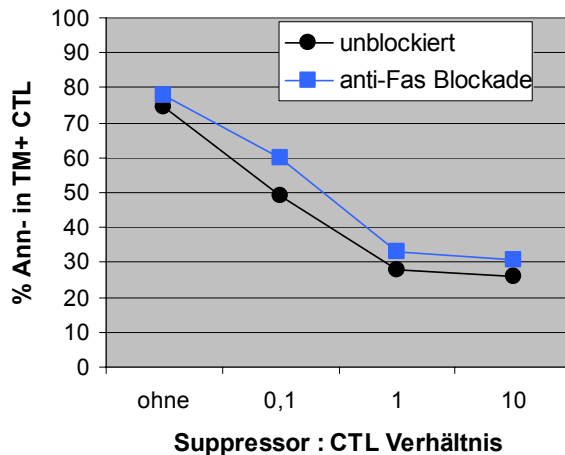


Abb. 36:

Fas/FasL unabhängige Apoptose-Induktion in Antigen-spezifischen CTL durch DN T-Zellen. Analyse der Apoptose-Inhibition durch den Einsatz des neutralisierenden, monoklonalen anti-Fas-Antikörpers (Klon ZH-4) in einem Apoptose-Test mit dem konditionierten $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zell-Klon 1D6. Dargestellt ist der Anteil vitaler, spezifischer CTL innerhalb der CD8^+ CTL (Zielzellen) nach Kokultur mit einer ansteigenden Menge von konditionierten $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen (Effektorzellen). Schwarze Kreise: Unblockierte CD8^+ CTL; gefüllte blaue Kästchen: CTL wurden für 30 min mit anti-Fas-Antikörper blockiert.

Wie in Abb. 36 dargestellt, kommt es durch die Blockierung der DN T-Zellen mit einem neutralisierenden, monoklonalen anti-Fas Antikörper zu keiner Inhibition der Apoptose von Antigen-spezifischen CTL. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die Wechselwirkung zwischen Fas und FasL keine bedeutende Rolle für die Apoptose-Induktion durch DN T-Zellen spielt.

Es wurde auch versucht, oberflächenständige FasLigand-Moleküle auf den DN T-Zellen nachzuweisen. Um eine mögliche niedrige Expression von FasLigand-Molekülen zu verstärken, wurde ein enzymatisches Verstärkungssystem für die Antikörperfärbung eingesetzt. Dabei wurden sowohl sortierte $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen als auch der $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zell-Klon 1D6 untersucht. Die DN T-Zellen wurden nach 24-stündiger Koinkubation mit autologen, reifen dendritischen Zellen für die Analyse verwendet. Es konnte keine Expression von FasL auf der Oberfläche von DN T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 37).

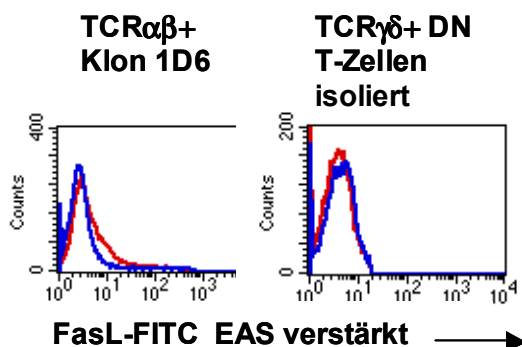


Abb. 37: Fehlende Expression von FasLigand auf der Zelloberfläche des $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zell-Klons 1D6 (linkes Histogramm) und auf der Zelloberfläche von sortierten $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen (rechte Histogramme). Die 1D6 Zellen wurden der Klon-Expansionskultur entnommen, die $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen wurden durch Fluoreszenzsortierung aufgereinigt. Blaue Histogramme: Isotypenkontrolle; Rote Histogramme: anti-FasL- Antikörper (Klon NOK-1). Das Fluoreszenzsignal wurde enzymatisch verstärkt.

4.1.7 Die Rolle von DN T-Zellen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen

Da DN T-Zellen, wie in den vorherigen Abschnitten gezeigt, eine immunregulatorische Funktion ausüben, wurde diese T-Zell-Subpopulation bei Patienten mit neu diagnostizierten Autoimmunerkrankungen (Rheumatoide Arthritis, Sjögren Syndrom, Lupus erythematoses, Diabetes mellitus Typ-I, Multiple Sklerose) untersucht. Hierfür wurde peripheres Blut von unbehandelten Patienten gesammelt und nach Separation der mononukleären Zellfraktion eine Charakterisierung der T-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle dienten periphere, mononukleäre Zellen gesunder Spender.

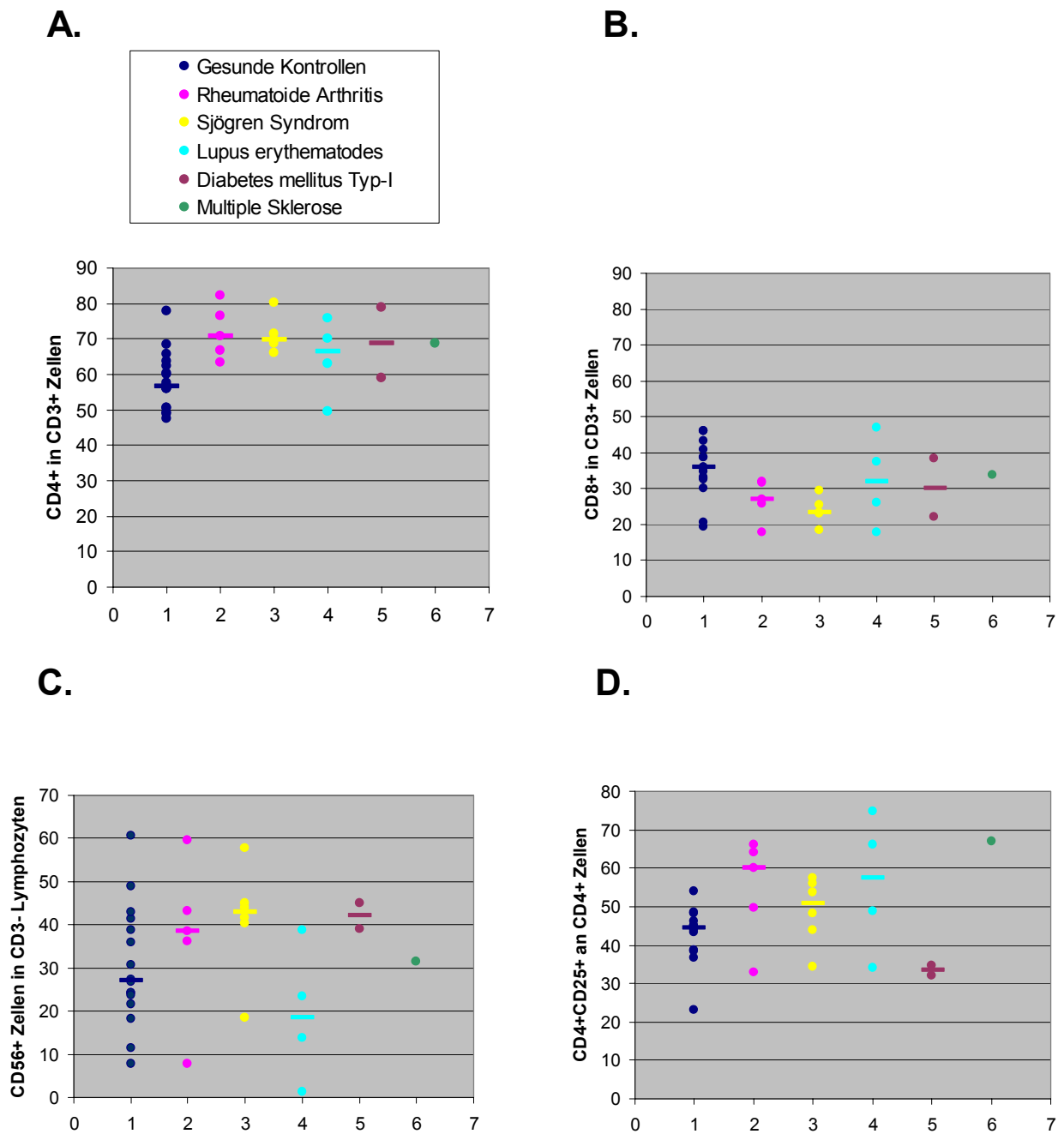
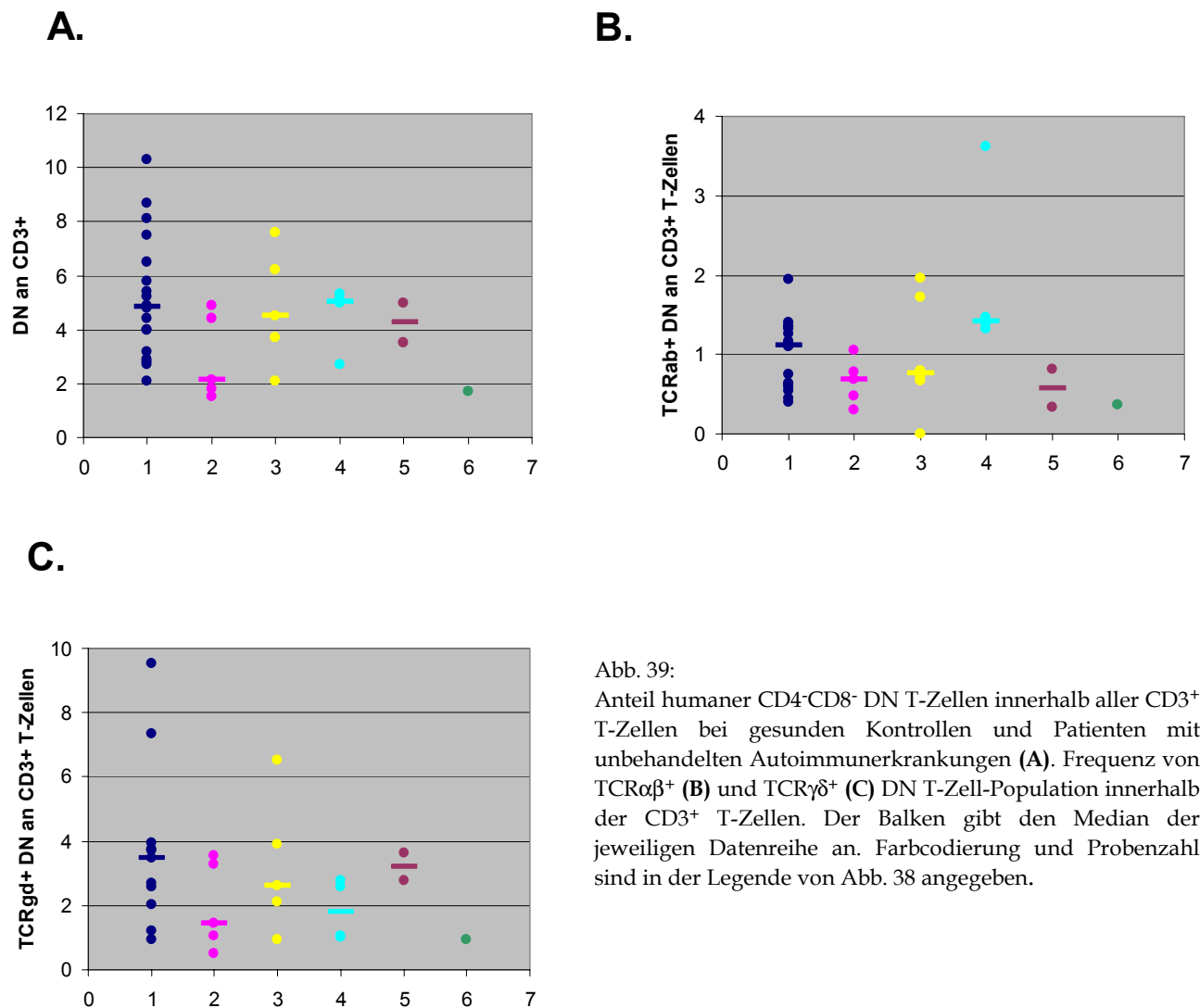


Abb. 38: Charakterisierung von T-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut von Patienten mit Autoimmunerkrankungen: **(A)** CD4⁺ Helferzellen und **(B)** CD8⁺ Killerzellen innerhalb der CD3⁺ T-Zellen. **(C)** Anteil der CD56⁺NK-Zellen innerhalb der CD3⁻ Lymphozytenfraktion und **(D)** CD4⁺CD25⁺ T - Zellen innerhalb der CD4⁺ Helferfraktion. Die farbliche Kodierung der verschiedenen Erkrankungen ist in der Legende dargestellt. Anzahl untersuchter Proben: Gesunde Kontrollen (n = 18), Rheumatoide Arthritis (n = 5), Sjögren Syndrom (n = 5), außer für die Auswertung der NK-Zellen: (n = 6), Lupus erythematosus (n = 4), Diabetes mellitus (n = 2), Multiple Sklerose (n = 1). Der Balken gibt den Median der jeweiligen Datenreihe an.

Die Proben der Patienten mit Autoimmunerkrankungen wiesen leichte Veränderungen in der Frequenz verschiedener T-Zell-Populationen auf. Tendentiell treten die CD4⁺ Helferzellen anteilmäßig an allen CD3⁺ T-Zellen mit leicht erhöhter Frequenz auf, während die CD8⁺ Killerzellen leicht unterrepräsentiert sind (Abb. 38). Die Frequenz CD56⁺ natürlicher Killerzellen (NK) innerhalb der CD3⁻ Lymphozytenpopulation war in

den untersuchten Patientenproben leicht erhöht, ebenso die Frequenz $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten, deren immunregulatorische Funktion eingangs erläutert wurde. Da jedoch das CD25-Molekül nicht nur ein Marker für $CD25^+$ Suppressorzellen, sondern auch für aktivierte T-Helferzellen ist, ist es nicht möglich, zwischen diesen beiden Populationen zu unterscheiden.



Auch die Subpopulation humaner DN T-Zellen zeigt bei den Patienten mit Autoimmunerkrankungen Abweichungen zu derjenigen gesunder Spender: Die Frequenz der DN T-Zellen innerhalb der $CD3^+$ T-Zellen scheint bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen tendentiell leicht verringert zu sein (siehe Abb. 39 A - C). Die Frequenzen der DN T-Zellen liegen bei den Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe fast ausschließlich im unteren Wertebereich, während hohe Frequenzen von DN T-Zellen ($> 6\%$) von den Patienten kaum erreicht werden. Dieser Abfall der DN T-Zellen kommt insbesondere durch eine Unterrepräsentation von $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zellen zustande (Abb. 39 C). Bei

Patienten mit rheumatoider Arthritis ist die verringerte Frequenz von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ und $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen am ausgeprägtesten.

Deutlicher sind die Differenzen zwischen Patienten und gesunden Spendern bezüglich der Expression von CD45RA und CD45RO auf den DN T-Zellen. Während allgemein die Expression von CD45RA für einen naiven Phänotyp von T-Zellen spricht, gilt CD45RO als Marker für induzierte Effektorzellen. Da bisher über den Phänotyp humaner DN T-Zellen wenig bekannt ist, wurden diese beiden Marker, welche aus der Phänotypisierung von klassischen Helfer- und Killerzellen bekannt sind, verwendet, um eine grobe Unterscheidung in "naiven" und "aktivierten" Phänotyp innerhalb der DN T-Zellen zu liefern. In Abb. 40 ist deutlich ersichtlich, dass DN T-Zellen von Patienten mit Autoimmunerkrankungen einen eher naiven Phänotyp zeigen. Die Proben von Patienten mit rheumatoider Arthritis wiesen teilweise 40% mehr CD45RA^+ DN T-Zellen auf und besaßen dagegen weniger CD45RO^+ Zellen als die gesunden Probanden (siehe Abb. 40 A und B). Die Frequenz CD45RA^+ innerhalb der DN T-Zellen liegt bei allen Patientenproben über dem Median der gesunden Werte. Dieser Befund könnte ein Zeichen dafür sein, dass diese Zellen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen ruhen bzw. naiv sind und keine regulatorische Effektorfunktion ausüben.

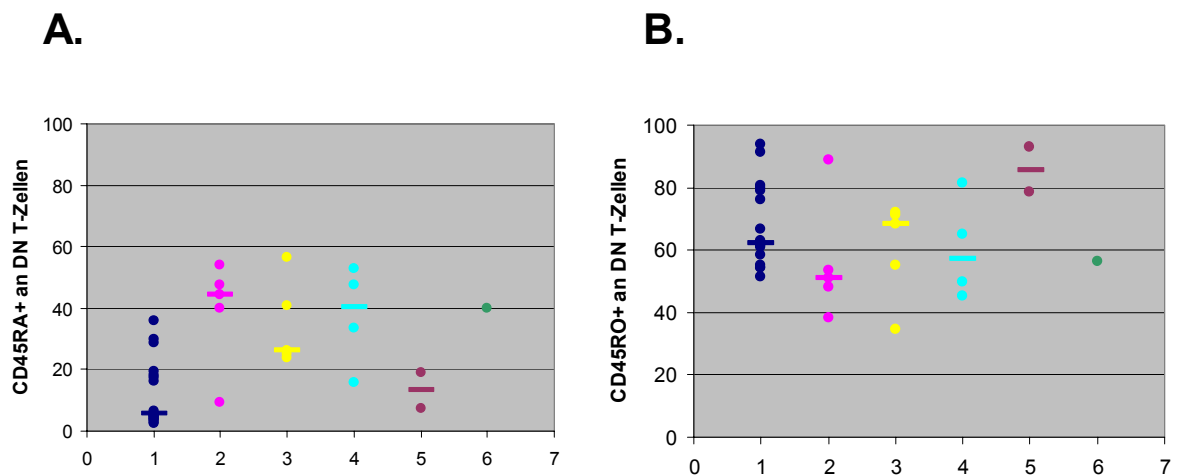


Abb. 40: Anteil CD45RA^+ (A) und CD45RO^+ (B) Zellen in der DN T-Zell-Population gesunder Spender und von Patienten mit Autoimmunerkrankungen. Die Balken geben den Median der jeweiligen Datenreihe an. In die CD45RO^+ Population wurden auch CD45RA und CD45RO koexprimierende Zellen eingeschlossen. Farbcodierung und Probenzahl sind in der Legende von Abb. 38 angegeben.

Wenn man eine Auswertung der CD3^{high} und der CD3^{low} exprimierenden Subpopulation der DN T-Zellen durchführt, so zeigt sich, dass die vorher erwähnten Unterschiede in der CD45RA/RO -Population vor allem in der CD3^{high} Population von DN T-Zellen zu finden sind (vgl. Abb. 41 A/B CD3^{low} versus C/D CD3^{high}): In der CD3^{high} Population befinden sich erhöhte Frequenzen naiver CD45RA^+ Zellen und stark verringerte Frequenzen von CD45RO^+ Zellen.

Die $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T Zellen, welche bevorzugt CD3^{high} exprimieren (siehe Abb. 4), zeigen also die Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und Patienten mit Autoimmunerkrankungen am ausgeprägtesten. Eine weitere experimentelle Absicherung der Befunde ist angestrebt, jedoch aufgrund des notwendigen ausführlichen Gatings der Zellen im Durchflusszytometer sehr aufwändig. Drei von vier zur Verfügung stehenden Kanälen müssen nur für das Gating von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ bzw. TCRab^+ DN T-Zellen verwendet werden.

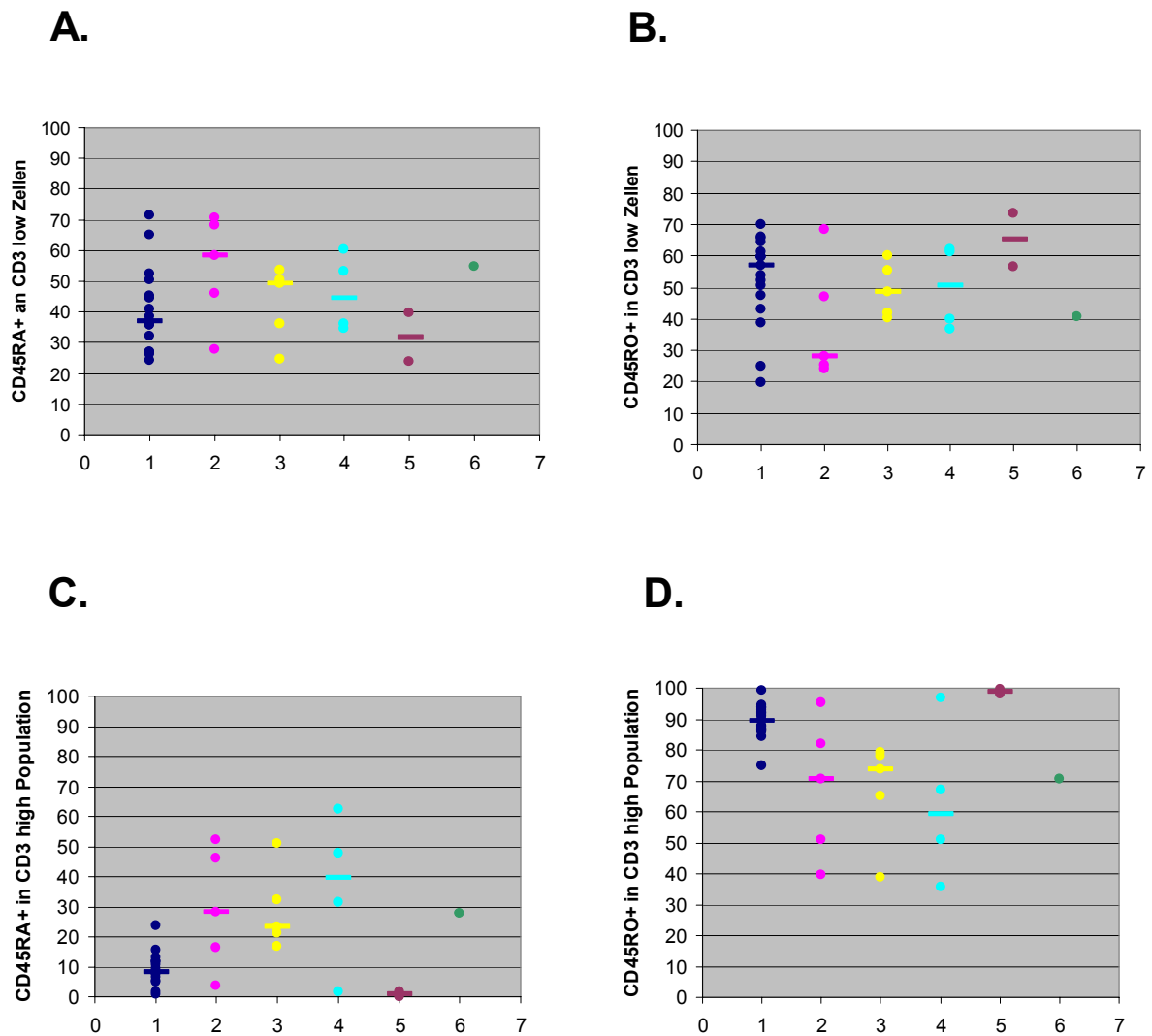


Abb. 41: Darstellung des Anteils CD45RA^+ (A und C) und CD45RO^+ (B und D) innerhalb der CD3^{high} und der CD3^{low} exprimierenden DN T-Zell-Population. Der Balken gibt den Median der jeweiligen Datenreihen an. Farbcodierung und Probenzahl sind in der Legende von Abb. 38 angegeben.

4.2 pMHC-Moleküle als Effektorstrukturen

4.2.1 Suppression durch MHC-I-Moleküle im T2 Modellsystem

4.2.1.1 Die T2 Zelllinie

Die T2 Zelllinie ist, wie in der Einleitung (Abschnitt 2.2.2) beschrieben, ein HLA-A2⁺ humanes, lymphoblastäres Hybridom aus T- und B-Zelle. T2 Zellen wurden zunächst phänotypisch auf verschiedene T- und B-Zell-Antigene untersucht. Hierfür wurden T2 Zellen über Nacht bei 30 °C in serumfreiem Medium mit 30 µg/ml eines HLA-A2-bindenden Peptids (Melan-A) beladen. Anschließend wurden Melan-A-beladene bzw. unbeladene T2 Zellen mit monoklonalen Antikörpern auf die Expression von in Tab. 2 aufgeführten Oberflächenantigenen untersucht.

Durch die Peptidbeladung kommt es zu einer verstärkten Expression von MHC-I-Molekülen (HLA-A2 und HLA-ABC), welche durch eine Stabilisierung der MHC-I-Komplexe erklärt werden kann. Die Expression aller anderen Antigene wird durch die Beladung der T2 Zellen nicht beeinflusst. Die Oberflächenexpression von FasLigand wurde mit einer enzymatisch verstärkten Antikörperfärbung ermittelt.

	unbeladen	beladen
HLA-A2	+	++
MHC I	+	++
CD3	+	+
CD11a	+	+
CD11b	-	-
CD11c	+	+
HLA-DR	-	-
HLA-DQ	-	-
CD20	+	n.d.
CD86	+	+
CD80	+	+
CD83	+	+
CD54	+	+
CD58	-	-
CD40	+	+
CD95	++	++
TRAIL	-	-
TCRαβ	-	-
FasLigand	-	n.d.

Tab. 2:

Durchflusszytometrische Charakterisierung der Expression von MHC-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen, Adhäsionsmolekülen, Todesrezeptoren und sonstigen Oberflächenantigenen auf der T2 Zelllinie mittels monoklonaler Antikörper.

Die exogene Beladung freier MHC-Bindungstaschen mit einem HLA-A2-bindenden Peptid führt zur Hochregulation von MHC-I/HLA-A2.

Durchschnittl. Fluoreszenzintensität < 10: -

Durchschnittl. Fluoreszenzintensität >10 und <100: +

Durchschnittl. Fluoreszenzintensität >100: ++

Nicht durchgeführte Experimente sind mit n.d. abgekürzt.

4.2.1.2 Der PKH26- Test

Der PKH26-Test ist ein von der Autorin etablierter Zytotoxizitätstest, der auf einer mit Fluoreszenzfarbstoffen basierten Apoptosemessung von Zielzellen beruht [194]. Er wird in einigen Versuchsansätzen zur Ermittlung der Apoptose von T-Zellen verwendet, weshalb er an dieser Stelle kurz erläutert werden soll.

Im PKH26-Test werden die Zielzellen mit dem fluoreszenten Membranfarbstoff PKH26 beladen. Dabei konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Beladung von Zielzellen mit PKH26 die Expression von Oberflächenantigenen nicht verändert [194]. Die PKH26-beladenen Zielzellen werden mit ansteigenden Mengen von Effektorzellen für 4 h in 96-well Mikrotiterplatten kokultiviert. Anschließend wird im Durchflusszytometer der Anteil AnnexinV positiver Zellen ermittelt. Die Färbung der Zielzellen mit PKH26 gewährleistet, dass die Zielzellen im Durchflusszytometer identifiziert und gated werden können. In Abb. 42 ist der Mittelwert von drei Apoptose-Tests mit Melan-A-spezifischen CTL als Effektorzellen und Melan-A-beladenen T2 Zellen als Zielzellen gezeigt. Aus den PKH26-Tests mit Melan-A-spezifischen CTL, welche im Rahmen der Etablierung dieses Testsystems durchgeführt wurden, können zwei methodische Kernaussagen abgeleitet werden:

Erstens korreliert die Lyse von Zielzellen in den ersten Stunden des Kontaktes zwischen Effektor- und Zielzellen sehr gut mit der AnnexinV-Positivität der Zielzellen. Eine zusätzliche Propidium-Iodid(PI)-Färbung im PKH26-Test ergab, dass der Zellschaden mit der Ermittlung der AnnexinV⁺ Zellen optimal erfasst wird. Bei einer separaten Auswertung von Ann⁺/PI⁻, Ann⁺/PI⁺ und Ann⁻/PI⁺ Zielzell-Subpopulationen nach der Inkubationsphase zeigt sich, dass die Lyse von Zielzellen am besten korreliert mit der Annexin-Positivität (Abb. 43 A). Eine zusätzliche PI-Färbung zur Ermittlung toter/nekrotischer Zellen liefert keine weiteren Informationen (siehe Abb. 43 A).

Zweitens konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse des durchflusszytometrischen PKH26-Tests sehr gut mit den Resultaten der radioaktiven Standardmethode, dem ⁵¹Cr-Freisetzungstest, korrelieren. Hierfür wurde die Zytotoxizität von Melan-A-spezifischen CTL gegen Melan-A positive und Melan-A negative Tumoren parallel im PKH26-Test und im ⁵¹Cr-Freisetzungstest analysiert. Die Resultate zeigen eine sehr gute Korrelation (siehe Abb. 43 B).

Diese Befunde aus den Zytotoxizitätstests mit CTL als Effektorzellen wurden als Grundlage für die Detektion DN T-Zell-vermittelter Apoptose gewählt. Der PKH26-Test wurde für die Ermittlung der Apoptose im gesamten Abschnitt 4.2 verwendet.

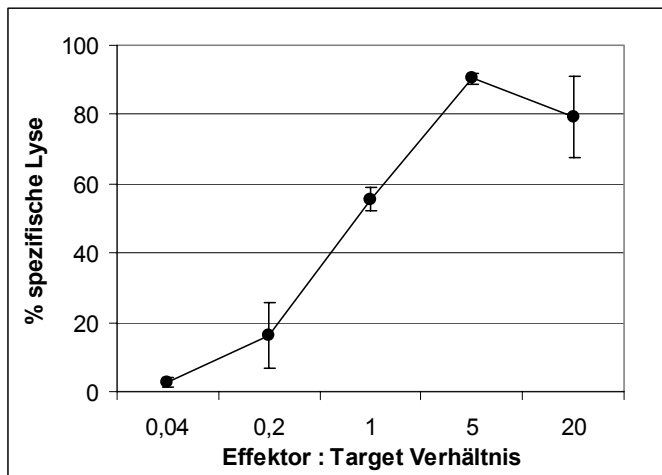
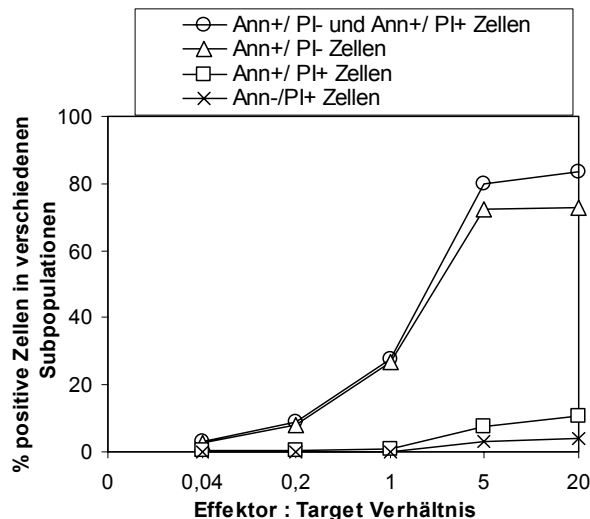


Abb. 42:

Ermittlung der Apoptose im 4 h PKH26-Zytotoxizitätstest. Effektorzellen: Melan-A-spezifische T-Zell-Linien verschiedener Spender. Zielzellen: Melan-A-beladene T2 Zellen. Dargestellt ist der Anteil apoptotischer Zellen innerhalb der PKH26⁺ Zielzellen (n = 3). Dieser Apoptose-Test wird für die Quantifizierung der Apoptose-Induktion durch Effektorzellen in einigen Versuchsansätzen in der vorgelegten Arbeit eingesetzt.

A.



B.

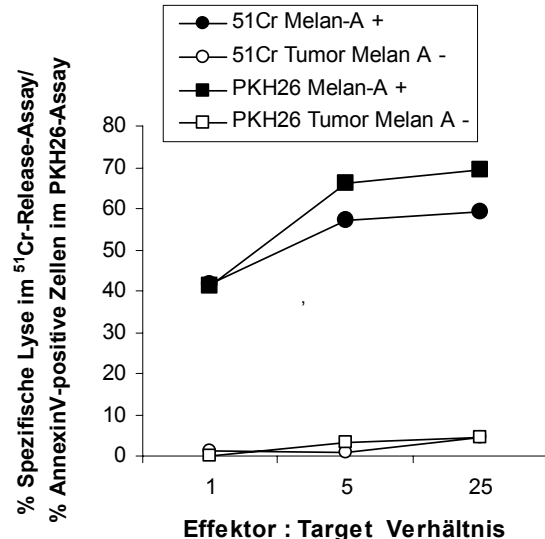


Abb. 43: (A) Korrelation zwischen dem Anteil Annexin-positiver Zellen und dem Zellschaden in Zielzellen. Melan-A-spezifische CTL wurden als Effektorzellen gegen Melan-A-beladene T2 Zellen (Zielzellen) eingesetzt. Nach 4 h Koinkubation wurden Ann⁺/PI⁻ sowie Ann⁺/PI⁺ und Ann⁻/PI⁺ T2 Zielzellen ausgewertet. Werden in der Auswertung alle Ann⁺ Zellen erfasst (Ann⁺/PI⁻ und Ann⁺/PI⁺, offene Kreise), kann der meiste Zellschaden erfasst werden. (B) Die Ermittlung der Zytotoxizität von Melan-A-spezifischen CTL gegenüber Melan-A positiven (gefüllte Symbole) und Melan-A negativen (offene Symbole) Tumorzellen mittels 4 h ⁵¹Cr-Freisetzungstest im Vergleich mit der Apoptosedetektion im PKH26-Test ergibt vergleichbare Resultate. Der Hintergrundwert für apoptotische Zellen/ bzw. ⁵¹Cr-Freisetzung wurde jeweils herausgerechnet.

4.2.1.3 Retrograde Apoptose-Induktion durch T2 Zellen

Wie sich im ersten Teil der Arbeit zeigte, können DN T-Zellen sehr effektiv Apoptose in Antigen-spezifischen CTL induzieren. Es sollte nun ein Modellsystem zur Untersuchung Antigen-spezifischer Suppression etabliert werden. Dafür wurde die Zelllinie T2 als Effektorzelllinie ausgewählt. Es sollte untersucht werden, ob von den Antigen-beladenen pMHC-Komplexen auf der T2 Zelle auch ein apoptotisches Signal für die Antigen-

spezifischen CTL ausgeht. Für diesen Versuch wurden CMV-spezifische und Melan-A-spezifische CTL als Zielzellen verwendet.

Es wurden zunächst zwei parallele PKH26-Tests durchgeführt, in denen T2 Zellen zum einen als Zielzellen, und zum anderen als Effektorzellen in Kokultur mit Antigen-spezifischen CTL eingesetzt wurden. Wie in Abb. 44 dargestellt, zeigte sich sowohl die bekannte "Vorwärts-Apoptoseinduktion" (CTL lysiert die T2 Zelle, Abb. 44 A), wie auch eine "retrograde Apoptose-Induktion" (T2 Zelle lysiert die CTL, Abb. 44 B).

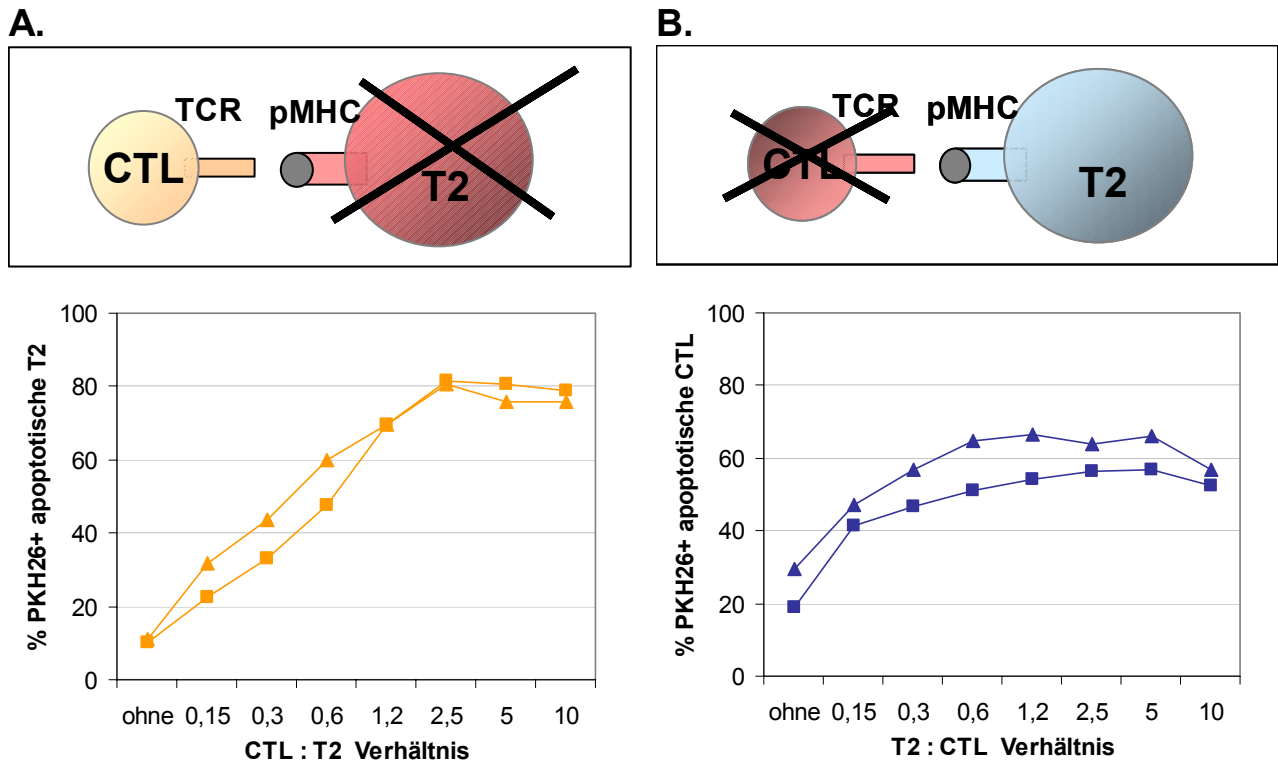


Abb. 44: Vorwärtsapoptose und retrograde Apoptose zwischen Antigen-spezifischen CTL und Antigen-beladenen T2 Zellen. **(A)** T2 Zellen als Zielzellen: CMV spezifische CTL lysieren CMV-Peptid-beladene T2 Zellen (orange Quadrate). **(B)** T2 Zellen als Effektorzellen: CMV-Peptid-beladene T2 Zellen induzieren Apoptose in CMV spezifischen CTL (retrograde Apoptose-Induktion, blaue Quadrate). Ermittlung der Apoptose im 4 h PKH26-Test mittels AnnexinV-Messung. Die T2 Zellen wurden mit 30 µg/ml CMV Peptid beladen. Ein zweites Experiment mit Melan-A- spezifischen CTL und Melan-A-beladenen T2 Zellen ist jeweils zusätzlich dargestellt (orange und blaue Dreiecke).

Das Phänomen der retrograden Apoptose-Induktion kann als Begleiterscheinung der Antigenerkennung der CTL angesehen werden. Um dieses Phänomen weiter abzuklären, wurde folgendes zusätzliche Experiment durchgeführt: Anstelle einer PKH26-Färbung der Zielzellen wurde eine MHC-Tetramer-PE-Färbung mit einer AnnexinV-Färbung kombiniert (Kanalbelegung im Durchflusszytometer wie in Tab. 1 dargestellt). Mit dieser Analyse kann das Schicksal der T-Zellen, die einen CMV-spezifischen TCR exprimieren, verfolgt werden. Wie in Abb. 45 sichtbar, sind es vor allem die TM⁺ Antigen-spezifischen CTL innerhalb der polyklonalen CTL-Linie, welche nach einem vierstündigen Kontakt mit Antigen-beladenen T2 Zellen apoptotisch werden. Im Gegensatz dazu bleibt die TM-

unspezifische CTL Population (Abb. 45, jeweils linke, untere Quadranten) auch bei höheren Effektor : Target Verhältnissen konstant AnnexinV negativ. Die apoptotische TM⁺ CTL Population wandert hingegen aus dem vitalen Quadranten (Abb. 45, jeweils linke, oberere Quadranten) ab in die AnnexinV-positiven rechtsgelegenen Quadranten. Auch in diesem Experiment ist die Herunterregulation des TCR auf den spezifischen T-Zellen deutlich erkennbar: Die apoptotischen Zellen verlieren aufgrund des spezifischen Kontaktes mit CMV-MHC-I Komplexen auf der T2 Zelle ihren TCR auf der Zelloberfläche und erscheinen als TM⁻ Zellen, die vor allem im Annexin⁺ Quadranten (Abb. 45, untere, rechte Quadranten) zu finden sind.

Dieses Problem wurde bereits in Apoptose-Tests mit DN T-Zellen beobachtet und an früherer Stelle erläutert (vgl. Abb. 28 B rechte Spalte, S. 73).

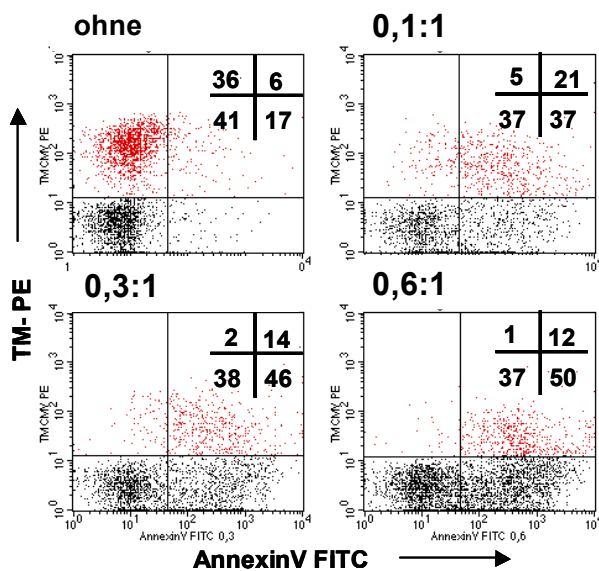


Abb. 45: Apoptose-Induktion in CMV-spezifischen CTL nach Inkubation mit CMV-Peptid-beladenen T2 Effektorzellen. CMV-Peptid-beladene T2 Zellen wurden in den Verhältnissen 0,1:1; 0,3:1 und 0,6:1 als Effektorzellen verwendet. Zielzellen sind CMV-spezifische CTL. Für dieses Experiment kamen dieselben Zellen wie in Abb. 44 zum Einsatz. Mittels einer CMV-MHC-Tetramer (TM)-PE Färbung (y-Achse) nach dem 4 h Apoptose-Test kann die Apoptose-Induktion in den Antigen-spezifischen CTL nach dem Kontakt mit T2 Effektorzellen verfolgt werden. Der prozentuale Anteil der Zellen in den einzelnen Quadranten an der Gesamtzellzahl ist in den Dotplots angegeben. Auf der x-Achse sind die apoptotischen Zellen, ermittelt anhand der AnnexinV Färbung, dargestellt. Die Kanalbelegung im Durchflusszytometer entspricht Tab. 1.

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob pMHC-I Komplexe die Schlüsselmoleküle bei der retrograden Apoptose-Induktion darstellen bzw. ob die Apoptose-Induktion Antigen-spezifisch ist. Hierzu wurden T2 Zellen, die mit einem irrelevanten Peptid (gp100) beladen wurden bzw. unbeladene T2 Zellen in den Apoptosetest eingesetzt (Abb. 46). Die Apoptose-Induktion in den Antigen-spezifischen CTL wurde wiederum im PKH26-Test ausgelesen. Dabei zeigte sich klar, dass nur T2 Zellen, welche mit dem adäquaten Peptid beladen sind, zur Apoptose-Induktion von CTL befähigt sind. Obwohl die Beladung der T2 Zellen mit Melan-A sogar mit weniger Peptid (3 ng/ml) durchgeführt wurde als die Beladung mit gp100-Beladung (30 µg/ml), geht aus dem Versuch deutlich die Antigen-spezifität der retrograden Apoptose-Induktion hervor.

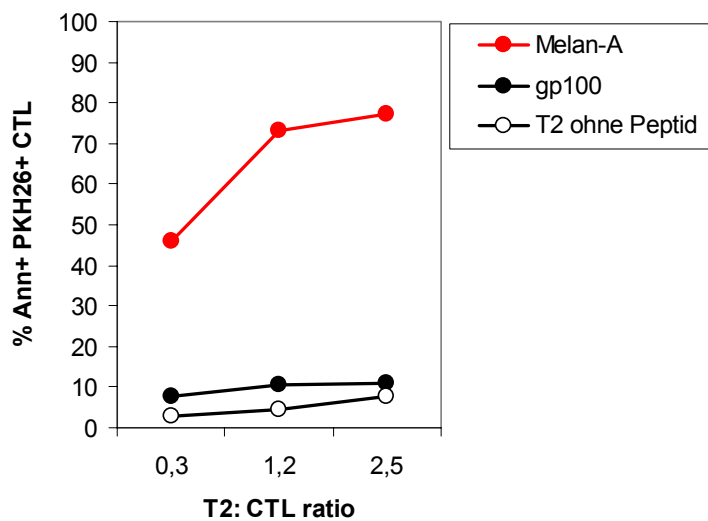


Abb. 46:

Antigen-spezifische Apoptose-Induktion in zytotoxischen T-Zellen durch Peptid-beladene T2 Zellen. T2 Zellen wurden mit unterschiedlichen Peptiden beladen und auf ihre Fähigkeit, Apoptose in Melan-A-spezifischen CTL zu induzieren, getestet. Eingesetzte Peptidkonzentration für die Beladung der T2 Zellen: 30 µg/ml gp100, 3 ng/ml Melan-A. 4 h Koinkubation von Effektor- und Zielzellen im PKH26-Test.

Eine Titration der Peptidbeladung von T2 Zellen sollte zeigen, dass die Apoptose-Induktion in CTL mit der gebundenen Peptidmenge korreliert. Hierfür wurde ein retrograder PKH26 Apoptose-Test durchgeführt, in dem T2 Zellen, welche mit unterschiedlichen Konzentrationen von Melan-A-Peptid beladen worden waren, als Effektorzellen verwendet wurden. Melan-A-spezifische CTL dienten als Zielzellen. Wie in Abb. 47 dargestellt ist, lässt sich die Apoptose-induzierende Wirkung der Peptid-beladenen T2 Zellen durch eine Titration des Peptides vermindern. Da sich die T2 Zellen aufgrund ihrer TAP-Defizienz sehr effektiv exogen mit Peptiden beladen lassen, bedarf es einer 10^4 - bis 10^5 -fachen Verdünnung des Peptids, um diesen Effekt zu vermindern (Abb. 47).

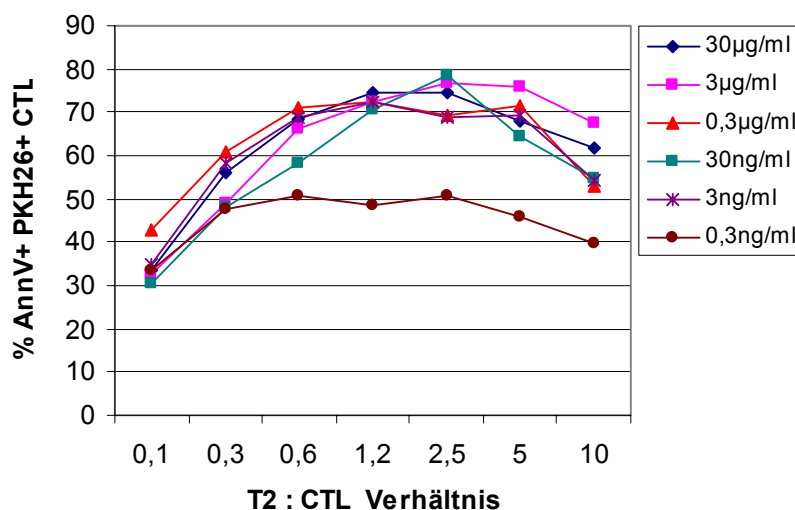


Abb. 47:

Verminderung der Apoptose-Induktion in Antigen-spezifischen CTL durch Titration der Peptidkonzentration auf den T2 Zellen. T2 Zellen wurden mit Melan-A Peptid in einer Konzentration von 0,3 ng/ml bis 30 µg/ml beladen und gegen PKH26⁺ Melan-A-spezifische CTL eingesetzt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil AnnexinV⁺ CTL innerhalb der gesamten CTL nach Koinkubation mit Peptid-beladenen T2 Zellen in T2 : CTL Verhältnissen von 0,1 : 1 bis 10 : 1.

4.2.1.4 Mechanismen der retrograden Apoptose-Induktion durch T2 Zellen

Anschließend wurde untersucht, ob die T2 Zellen ihre Apoptose-induzierende Funktion unabhängig von zytoplasmatischen Proteinen ausüben. Hierzu wurden die T2 Zellen nach Peptidbeladung mit 1% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und im retrograden PKH26-Apoptose-Test eingesetzt. Fixierte bzw. vitale Peptid-beladene T2 Zellen dienten als Effektorzellen gegenüber Melan-A-spezifischen CTL.

Durch die Formaldehyd-Behandlung der T2 Zellen wird eine Konservierung und Inaktivierung der gesamten Proteine erreicht und die Aktivität der T2 Zelle in Form einer Ausschüttung von Granulae oder Multimer-Bildung von Rezeptoren verhindert. Wie in Abb. 48 dargestellt, können fixierte T2 Zellen ähnlich effektiv wie vitale T2 Zellen Apoptose in CTL induzieren. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass von den Melan-A-beladenen T2 Zellen für die Apoptose-Induktion in CTL keine Aktivität ausgehen muss, sondern dass vielmehr passive Oberflächenmoleküle auf der T2 Zelle für die Apoptose-Induktion verantwortlich sind. Dieses Ergebnis spricht gegen eine Beteiligung des Perforin/Granzyme Signalweges bei der Apoptose-Induktion, da hierfür eine Ausschüttung von lytischen Granulae notwendig ist.

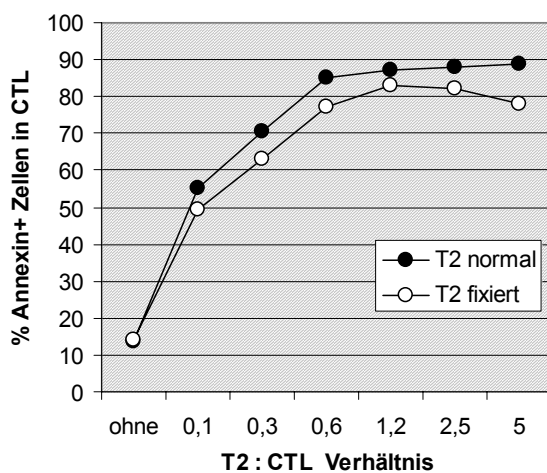


Abb. 48:

Paraformaldehyd-Fixierung der Peptid-beladenen T2 Zellen führt zu keiner Inhibierung der Apoptose-Induktion in Antigen-spezifischen CTL.

Als Effektorzellen wurden vitale und mit 1% PFA fixierte Melan-A-beladene T2 Zellen eingesetzt. Als Zielzellen wurden Melan-A-spezifische CTL verwendet. Die Apoptose-Induktion wurde im PKH26-Test mittels AnnexinV-Färbung ermittelt (y-Achse). Effektor- und Zielzellen wurden in T2 : CTL Verhältnissen von 0,1 : 1 bis 5 : 1 für 4 h bei 37 °C inkubiert.

Darüber hinaus zeigten Versuche mit einem blockierenden anti-MHC-Klasse-I-Antikörper (Klon W6/32), dass die retrograde Apoptose-Induktion durch T2 Effektorzellen inhibierbar ist. Eine Blockierung der pMHC-I-Komplexe war jedoch nur dann erfolgreich, wenn für die Beladung der T2 Zellen eine nicht zu große Menge (< 3 ng/ml) Peptid eingesetzt wurde (siehe Abb. 49).

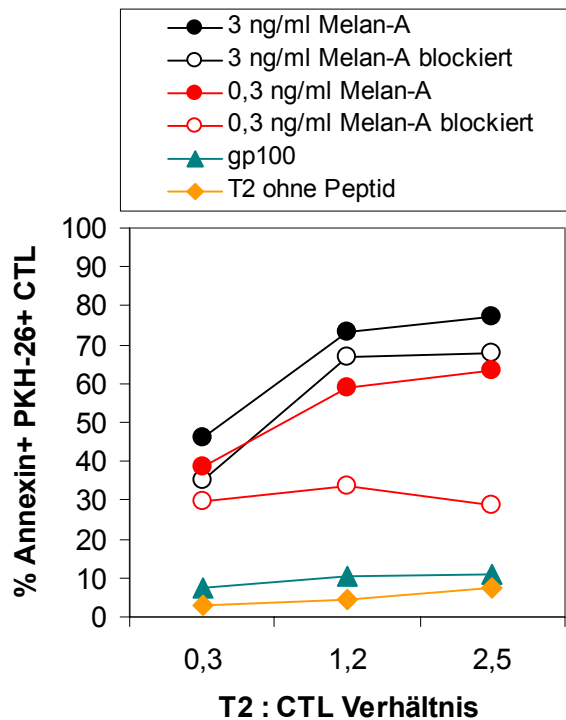


Abb. 49: Inhibierung der Apoptose-Induktion von Antigen-spezifischen CTL durch Blockierung der pMHC-Moleküle auf T2 Zellen. Effektor-T2 Zellen wurden mit 3 ng/ml (schwarz) oder 0,3 ng/ml (rot) Melan-A Peptid beladen und auf ihre Fähigkeit, Apoptose in Melan-A-spezifischen CTL zu induzieren, getestet (gefüllte Kreise). Parallel wurden beide Ansätze mit CTL durchgeführt, die mit dem blockierenden Antikörper W6/32 vorbehandelt wurden (offene Kreise). Unbeladene T2 Zellen (gelbe Rauten) oder mit 30 µg/ml Kontrollpeptid (gp100) -beladene T2 Zellen (grüne Dreiecke) wurden als Kontrollen verwendet. Es ist ein repräsentatives Einzelexperiment gezeigt.

Somit konnte eine ursächliche Beteiligung von pMHC-I-Molekülen an der Induktion der Apoptose in den Antigen-spezifischen CTL bewiesen werden. Dennoch kann eine Involvement von Todesrezeptoren auf den T2 Effektorzellen nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grunde sollte eine Blockade von Fas auf den CTL eine Aussage darüber liefern, ob der Fas/FasL Pathway bei der Apoptose-Induktion im Modellsystem mit T2 Zellen beteiligt ist. In Abb. 50 (blaue Linien) ist das Resultat des Einsatzes von Fas-blockierten CTL im Vergleich zu unbehandelten CTL gezeigt. Die Melan-A-spezifischen CTL wurden vor dem Apoptose-Test für 30 min bei 4 °C mit einem blockierendem anti-Fas-Antikörper (Klon ZH-4) bzw. mit einer IgG1-Isotypkontrolle vorbehandelt. Anschließend wurde ebenso wie mit unbehandelten Zellen eine Kokultur mit Melan-A-beladenen T2 Effektorzellen durchgeführt. Wie in Abb. 50 gezeigt, konnte jedoch keine Inhibition der Apoptose-Induktion in den CTL erreicht werden.

Außerdem wurde die Abhängigkeit des Apoptosewegs von Caspasen untersucht. Hierfür kam DEVD-FMK, ein synthetisches Peptid und zugleich Zellmembran-gängiger Inhibitor der Caspase-3, zum Einsatz. Die CTL wurden vor dem Test für 30 min mit DEVD-FMK inkubiert. Wie jedoch in Abb. 50 zu sehen ist, kann durch die Anwendung von DEVD-FMK keine Blockierung des Effektes erreicht werden. Weitere Experimente müssen zeigen, ob andere Caspasen an der Vermittlung der Apoptose beteiligt sind.

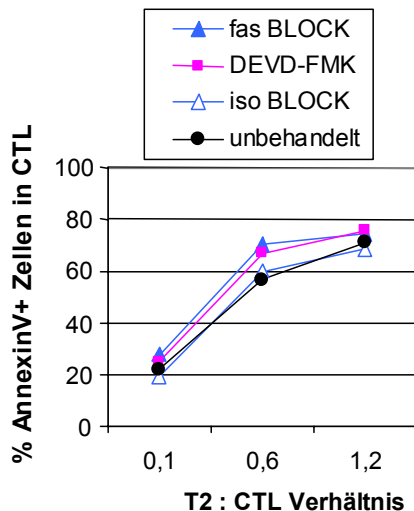


Abb. 50:

Untersuchungen zum Mechanismus der retrograden Apoptose-Induktion durch T2 Zellen. Als Zielzellen wurden unbehandelte CTL verwendet (schwarze Kreise), mit anti-Fas-Antikörper (Klon ZH-4) vorbehandelte CTL (blaue, geschlossene Dreiecke), mit Isotyp (IgG1, MOP21-C) vorbehandelte Kontroll-CTL (blaue, offene Dreiecke) oder DEVD-FMK vorbehandelte CTL (rosa Kästchen). Als Effektorzellen wurden in allen Ansätzen T2 Zellen verwendet, die mit 0,3 ng/ml Melan-A-beladen wurden. Kokultur von Effektor: Zielzellen im Verhältnis 0,1 : 1; 0,6 : 1 und 1,2 : 1 für 4 h bei 37 °C. Durchflusszytometrische Ermittlung AnnexinV positiver Zellen. Endkonzentration Isotypkontrolle und anti-FAS- Antikörper: 10 µg/ml;

4.2.2 Apoptose-Induktion durch Melan-A-exprimierende Tumorzellen

Um zu verifizieren, dass die retrograde Apoptose-Induktion durch T2 Zellen kein Artefakt der exogenen Beladung ist bzw. die Verwendung einer modifizierten Zelllinie artifizielle Resultate liefert, wurden im nächsten Abschnitt Effektorzellen verwendet, die endogen prozessiertes Melan-A auf der Zelloberfläche exprimieren.

Hierfür kamen zwei HLA-A2 positive Melanom-Zelllinien (MeI493 [Melan-A⁺⁺] und Me275 [Melan-A⁺⁺]) zum Einsatz. Es sollte untersucht werden, ob die Tumorzellen ihre endogen-prozessierten pMHC-I-Komplexe zur Apoptose-Induktion in Melan-A-spezifischen CD8⁺ CTL einsetzen. Als Kontrollzelllinie wurde Na8 [HLA-A2⁺, Melan-A⁻] eingesetzt. Alle drei Zelllinien wurden auf ihre intrazelluläre HLA-A2- und Melan-A-Expression untersucht (siehe Abb. 51).

Anschließend wurden die Tumorzelllinien in retrograden PKH26-Tests als Effektorzellen gegen Melan-A-spezifische CTL eingesetzt. Als Zielzellen fungierten Melan-A-spezifische CTL. In Abb. 52 sind die Resultate einer vierstündigen Kokultur von Melan-A-spezifischen CTL mit ansteigenden Mengen von Tumorzellen dargestellt. Die Melan-A-spezifischen CTL werden von den Melan-A-exprimierenden Tumorzellen (MeI493, Me275) bis zu 50 - 60% lysiert, jedoch nicht von der Melan-A-negativen Kontroll-Tumorzelllinie Na8. Erst durch eine exogene Beladung der Na8-Zellen mit 30 µg/ml Melan-A für 3 h bei 37 °C werden die Na8 Zellen zu einer starken retrograden Apoptose-Induktion von Antigen-spezifischen CTL befähigt: Im Kontakt mit den exogen mit Melan-A-beladenen Na8 Zellen sterben über 90% der CTL ab.

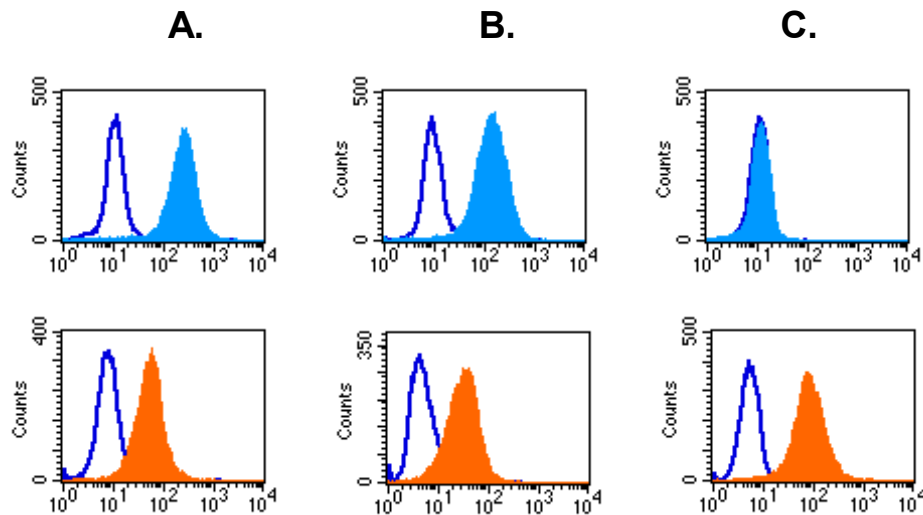


Abb. 51: Intrazelluläre Antikörperfärbung gegen Melan-A (blaue Histogramme) und HLA-A2 (orange). Verwendete Tumorzelllinien: Me275 (A), MeI493 (B) und Na8 (C). Die zugehörigen Isotyp-Kontrollen sind in jedem Plot als dunkelblaue Linie angegeben.

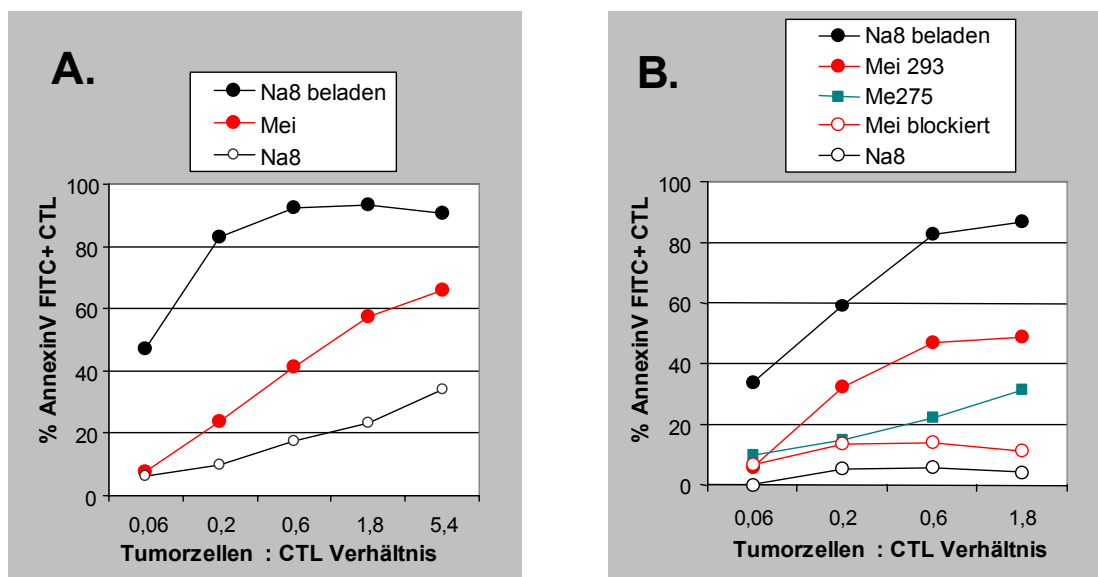


Abb. 52: Apoptose-Induktion von Melan-A-spezifischen CTL durch HLA-A2⁺ Melan-A-exprimierende Tumorzellen. Als Zielzellen wurden in den zwei unabhängigen Experimenten Melan-A-spezifische CTL Linien von Spender 064 (A) und 069 (B) verwendet. Als Effektorzellen wurden in beiden Ansätzen verschiedene HLA-A2⁺ Melanom-Zelllinien verwendet: Mei493 (rot, gefüllt) und Me275 (grün), Melan-A-Kontrolltumorzelllinie Na8 (schwarz, offen). Außerdem wurden Na8 Zellen verwendet, die exogen mit Melan-A-beladen wurden (schwarz, gefüllt) und MeI493 Tumorzellen, die mit W6/32 blockiert wurden (rot, offen). Gezeigt ist hier die Apoptose-Induktion ermittelt anhand der AnnexinV Bindung im PKH26-Test.

4.2.3 Apoptose von Antigen-spezifischen CTL durch lösliche pMHC-Komplexe

Wie bereits in der Einführung erwähnt, können lösliche, von Hepatozyten freigesetzte pMHC-Komplexe eine Deletion von allospezifischen CTL in Transplantationsmodellen induzieren.

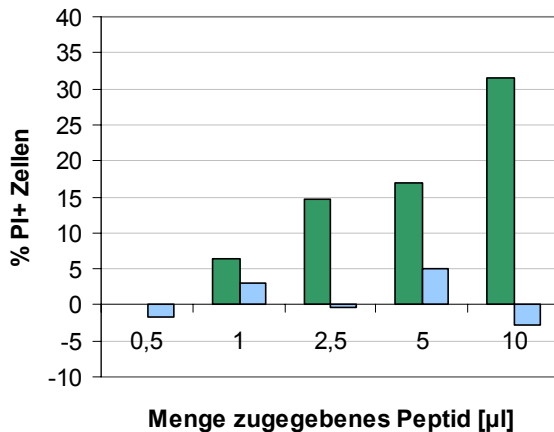


Abb. 53:

Induktion von Apoptose in Melan-A-spezifischen CTL durch Peptid-MHC-Tetramere. Adäquates Tetramer (Melan-A, grüne Balken) im Vergleich zu irrelevanten Peptid-MHC-Tetrameren (Mittelwerte für CMV-MHC-Tetramere und Tyrosinase-MHC-Tetramere, hellblaue Balken). Ermittlung Propidiumiodid (PI)-positiver CTL nach 14 h Inkubation. Der Hintergrund an PI-positiven Zellen im Ansatz ohne Tetramere wurde jeweils subtrahiert. Auf der x-Achse ist die zugegebene Menge an MHC-Tetramer pro 150 µl Zellsuspension angegeben.

Diese Apoptose-induzierende Eigenschaft löslicher pMHC-Komplexe sollte nun in einem Versuch verifiziert werden. Hierfür wurden 5×10^4 Melan-A-spezifische CTL/well in T-Zell-Stimulationsmedium ausplattiert und mit ansteigenden Konzentrationen verschiedener pMHC-Tetramere inkubiert. Nach 14-stündiger Inkubationszeit wurde der Anteil PI-positiver Zellen ermittelt. Als Kontrolle wurden Melan-A-spezifische CTL ohne Peptid-MHC-Tetramere inkubiert. Wie in Abb. 53 dargestellt, können Melan-A-MHC-Tetramere im Gegensatz zu irrelevanten Peptid-MHC-Tetrameren Apoptose in den Melan-A-spezifischen CTL induzieren. Nach Kontakt der CTL mit irrelevanten CMV-MHC-Tetrameren und Tyrosinase-MHC-Tetrameren befinden sich höchstens 5% PI⁺ Zellen in den CTL, während nach einem Kontakt mit Melan-MHC-Tetrameren über 30% der CTL PI⁺ sind (Abb. 53). In diesem Zielzell-freien System reicht die Präsenz von Peptid-MHC-Tetrameren für die Induktion von Apoptose in CD8⁺ Effektorzellen aus. Diese Resultate weisen darauf hin, dass für die Apoptose-Induktion der im Modellsystem verwendeten CD8⁺ CTL-Linien keine Todesrezeptoren auf den Zielzellen notwendig sind. Dennoch kann eine Beteiligung von löslichen Todesrezeptoren oder Todesrezeptoren auf Nachbar-T-Zellen, worauf in der Diskussion näher eingegangen wird, dadurch nicht ausgeschlossen werden.

5 Diskussion

5.1 Antigen-spezifische Immunregulation durch CD4- CD8-doppelnegative T-Zellen

Für murine DN T-Zellen ist beschrieben, dass die Akquisition von pMHC-Komplexen von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) eine Grundvoraussetzung ihrer suppressiven Funktion ist [28]. Im humanen System sind Daten zur Aufnahme von pMHC-Komplexen durch CD4⁺ Zellen [36], NK-Zellen [195] und CD8⁺ T-Zellen [35] veröffentlicht. Im murinen System konnte der Transfer von pMHC-Komplexen als Grundlage der supprimierenden Wirkung von DN T-Zellen identifiziert werden [28]. Im humanen System hingegen sind keine Daten zu einem pMHC-Transfer auf DN T-Zellen verfügbar. Aus diesem Grund wurden DN T-Zellen aufgereinigt bzw. von einem HLA-A2⁻ Spender kloniert, um die Fähigkeit der T-Zellen zu untersuchen, pMHC-Komplexe aufzunehmen. Dabei ist von besonderem Interesse, auf welchem Wege dieser Übergang von pMHC-Komplexen stattfindet, und ob dieser Prozess Antigen-spezifisch ist. Ein wesentliches Augenmerk ist darauf gerichtet, ob die erworbenen pMHC-Komplexe funktionell sind und ob die transferierten pMHC-Komplexe Antigen-spezifische Suppression vermitteln können.

5.1.1 Der pMHC-Transfer als Basis für die Suppressorfunktion

Der Nachweis für den Transfer von pMHC-I-Komplexen von APC auf DN T-Zellen wurde in Antikörperbindungsstudien mit dem anti-HLA-A2-Antikörper-Klon BB7.2 geführt. Hier konnte gezeigt werden, dass HLA-A2⁻ DN T-Zellen während einer Kokultur mit HLA-A2⁺ DC zeitabhängig HLA-A2-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche akkumulieren (Abb. 11). Wie in Transferexperimenten eindeutig gezeigt werden konnte ist der Zell-Zell-Kontakt zwischen DN T-Zelle und DC eine Grundvoraussetzung für die Aufnahme der pMHC-I-Moleküle (Abb. 10),.

In Parallelansätzen mit verschiedenen pMHC-Donoren desselben Spenders konnte gezeigt werden, dass DN T-Zellen pMHC-Komplexe am effizientesten von reifen DC aufnehmen können (Abb. 14). In der Transfereffizienz zwischen reifen DC und allen anderen verwendeten pMHC-Donoren gibt es Unterschiede: Reife DC >> unreife DC >> Mono > T-Zellen. Im Zuge der Maturierung von DC kommt es zu einer Hochregulation der Expression von MHC-I- Molekülen [191], was der Grund für die erhöhte pMHC-Transfereffizienz sein könnte. Es besteht offensichtlich eine direkte Korrelation zwischen der Stärke der Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen und der Menge der transferierten Moleküle (vgl. Abb. 14 und 15). Diese Korrelation, die einen zusätzlichen Hinweis auf eine unspezifische Art des Transfers darstellt, muss in weiteren Versuchen bestätigt werden. Es ist ferner anzunehmen, dass eine Kontaktaufnahme zwischen

pMHC-Donor und DN T-Zelle von der T-Zelle ausgeht, während die DC lediglich passiv am pMHC Transfer beteiligt ist. Dafür sprechen Transferexperimente, in welchen ein pMHC-Transfer stattfand, obwohl keine vitalen DC sondern lediglich DC-Lysate eingesetzt wurden (Abb. 10).

Noch offen ist, auf welchem Wege der Transfer von pMHC-Komplexen stattfindet, und welche Moleküle darin involviert sind. Es wird in der Literatur beschrieben, dass Ly49, ein murines C-type Lektin, in den Transfer von pMHC-Komplexen auf NK-Zellen involviert ist [195]. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch im humanen System C-type Lektine an diesem Prozess beteiligt sind, soll in Zukunft die Beteiligung von CD94 und anderen humanen C-type Lektinen am pMHC-Transfer durch Blockadeexperimente überprüft werden.

In der Literatur gibt es einige Hinweise auf einen Antigen-spezifischen, über den TCR vermittelten Transfer von pMHC-Komplexen auf T-Zellen ([35-37]). Huang et al. konnten zeigen, dass bereits ca. 5 min nach dem Kontakt zwischen dem TCR und dem pMHC-Molekül an der sog. "immunologischen Synapse" GFP-gekoppelte $Ld^+(MHC)$ -Moleküle in der T-Zelle nachweisbar sind [35]. Mikroskopische Analysen ergaben, dass das aufgenommene Ld^+ in hoher Konzentration in sauren Vesikeln vorliegt und nach etwa 30 min in intakter Form auf die Zelloberfläche der T-Zellen gelangt.

Eine Beteiligung des TCR kann jedoch für den hier beschriebenen Transferprozess mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Hierfür gibt es mehrere Hinweise: Erstens zeigt die Bindung des anti-HLA-A2-Antikörpers an die DN T-Zellen nach dem Transfer eine gleichmäßige Verschiebung in den positiven Bereich. Daraus ist ersichtlich, dass alle Zellen - unabhängig von ihrem TCR - HLA-A2-Moleküle aufnehmen. Wäre die Spezifität des TCR eine wichtige Größe in diesem Prozess, dann würde nur eine Teilpopulation von DN T-Zellen, die den adäquaten TCR exprimiert, positiv für HLA-A2 werden, während die restlichen DN T-Zellen negativ bleiben. Zweitens, können $TCR\gamma\delta^+$ DN T-Zellen, welche bekanntermaßen starke Invarianzen in den CDR3-Längen des TCR aufweisen, mindestens ebenso gut pMHC-Komplexe aufnehmen wie $TCR\alpha\beta^+$ DN T-Zellen (Abb. 12). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der TCR eine eher untergeordnete Rolle spielt. Das entscheidende Indiz ist jedoch der Transfer von pMHC-Molekülen auf den DN T-Zell-Klon 3B3, der nur einen spezifischen TCR exprimiert, jedoch pMHC-I-Komplexe von T2 Zellen, die mit zwei verschiedenen Peptiden (Melan-A und gp100) beladen wurden, gleich gut akquirieren konnte (vgl. Abb. 16). Auch vollkommen unbeladene pMHC-Komplexe scheint der Klon 3B3 akquirieren zu können (vgl. Abb. 16). Dies spricht dafür, dass die hochspezifische Wechselwirkung zwischen TCR und pMHC für den Transfer nicht essentiell ist.

Es ist zu diskutieren, ob Exosomen - 50 bis 90 nm große Membranvesikel - als Transportvehikel für pMHC-I-Komplexe fungieren. Ein Transport von Tumorantigenen auf DC mittels Exosomen konnte bereits belegt werden [196;197]. Außerdem wurde gezeigt, dass

Mikrovesikel (100 bis 200 nm Durchmesser) Chemokinrezeptoren zwischen verschiedenen Zellen transferieren können [198]. Dennoch ist eine Transporterfunktion von Membranvesikeln für pMHC-I-Komplexe von APC zu DN T-Zellen in dem gezeigten System nicht plausibel: Zum einen konnte in den vorliegenden Versuchen gezeigt werden, dass reife DC effizientere pMHC-Donoren sind als unreife DC, was im Gegensatz zu den Resultaten der Exosomenproduktion steht. Hier konnten Thery et al. zeigen, dass die Fähigkeit zur Exosomenproduktion eindeutig mit zunehmendem Reifegrad der DC abnimmt [199]. Auch die Transwellversuche beweisen, dass der Transfer sowohl von DC als auch der T2 Zelllinie auf DN T-Zellen abhängig vom Zell-Zell-Kontakt ist (siehe Abb. 10 und Abb. 16). Trotz einer Porengröße von $0,4\text{ }\mu\text{m}$ war kein pMHC-Transfer nachweisbar. Die Resultate der Transwellversuche sprechen sehr dafür, dass die pMHC-Komplexe nicht auf löslichem Wege auf die DN T-Zellen übergehen, obwohl vielfach das Vorkommen löslicher pMHC-Komplexe in verschiedenen Körperflüssigkeiten in der Literatur beschrieben ist [200-202].

Die erhobenen Daten werden unterstützt durch einige Befunde aus der Literatur: Es gibt Hinweise dafür, dass es Antigen-unabhängig zu einer Kontaktaufnahme zwischen DC und T-Zellen kommen kann. So wird berichtet, dass sich DC-T-Zell-Konjugate in Abwesenheit von Antigen formieren können [38]. Die Lebensdauer dieser Konjugate, so beschreiben Gunzer et al. aufgrund von Versuchen im dreidimensionalen System, ist für Ansätze mit und ohne Antigen vergleichbar [39]. Revy et al. berichten darüber hinaus von der Ausbildung Antigen-unabhängiger, funktioneller Synapsen zwischen T-Zellen und DC [40]. Diese Synapsenformierung hat zur Folge, dass verschiedene Oberflächenmoleküle an die Kontaktstelle geleitet werden, dazu gehören z.B. CD3, CD4, CD8 und CD45, sowie MTOCs (microtubule organizing centers) auf der Seite der T-Zelle. Dieser Artikel beschreibt zum ersten Mal, dass eine Antigen-unabhängige Synapsenformierung mit einer DC für eine T-Zelle funktionelle Konsequenzen haben kann, z.B. einen lokalen Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierung und einen leichten Anstieg des intrazellulären, freien Ca^{2+} .

Es ist denkbar, dass diese unspezifischen Synapsen auch zwischen DC und DN T-Zellen gebildet werden und die Grundlage für den Transfer von pMHC-Komplexen sind. In einer neuen Arbeit über HIV konnte gezeigt werden, dass DC Synapsen mit T-Zellen eingehen können und über eine starke lokale Anreicherung von HIV eine Infektion der beteiligten CD4^+ Zelle einleiten können [203]. Möglicherweise geht der Transfer von pMHC-I-Komplexen auf einem ähnlichen Weg vonstatten wie bei der Weitergabe von HIV.

Eine interessante Alternative für den unspezifischen Transfer von pMHC-Molekülen könnte ein Mechanismus sein, welcher von Stinchcombe et al. während der spezifischen Antigenerkennung beschrieben wird [29]. Hier wurden während eines Antigen-Kontaktes elektronenmikroskopisch Plasmamembranbrücken zwischen T-Zellen und Zielzellen

beobachtet. Sofern diese auch im Falle einer Antigen-unabhängigen Synapsenformierung auftreten, könnten die Moleküle aufgrund der Verschmelzung der beiden Membranbilayer durch direkte molekulare Diffusion auf die DN T-Zellen übergehen. Stinchcombe et al. vermuten, dass die Formierung einer Synapse eine Voraussetzung dafür ist, dass sich Plasmamembranbrücken ausbilden können.

In *in vitro* Experimenten wurde untersucht, ob die transferierten pMHC-Komplexe funktionell aktiv sind (Abb. 19 und 20). Dabei konnte in allogenen Versuchsansätzen nachgewiesen werden, dass DN T-Zellen mittels der akquirierten pMHC-Moleküle mit Antigen-spezifischen CTL interagieren und deren Apoptose induzieren können. Dieser Befund ist ein starker Hinweis für einen nativen Transfer der pMHC-Komplexe: Wenn das pMHC-Molekül unvollständig transferiert werden würde, so würde es zu keiner Antigen-Erkennung seitens der Melan-A-spezifischen CTL kommen.

Welche Relevanz hat nun der unspezifische pMHC-Transfer *in vivo*? Die Kinetik des Transfers zeigt deutlich, dass es sich bei der Aufnahme der pMHC-Komplexe um eine permanente Akkumulation von pMHC-Molekülen auf DN T-Zellen handelt (Abb. 11): Nach 24 h Kontakt mit DC sind etwa 30% der DN T-Zellen positiv für HLA-A2. Da der Transfer Zell-Zell-Kontakt abhängig ist, muss vermutlich ein längerer Kontakt zwischen DC und DN T-Zelle zustandekommen, damit der pMHC-Transfer gewährleistet ist. Orte, an denen gehäuft DC anzutreffen sind, sind die Lymphknoten, die Haut in Form von sog. Langerhans-Zellen, sowie die Peyers'schen Plaques des Darmes. Da TCR $\gamma\delta$ DN T-Zellen bevorzugt an Kompartimentgrenzen (Lunge, Darm, Haut) vorkommen, ist ein Aufeinandertreffen beider Zelltypen z.B. in Haut und Darm wahrscheinlich. Es ist unklar, inwiefern minimale Mengen transferierter pMHC-Moleküle für einen physiologischen Effekt sorgen können. Es ist dabei zu bedenken, dass durch die Antigen-spezifische Wirkung der DN T-Zellen auf eine sensitive Teilpopulation CD8-positiver Antigen-spezifischer T-Zellen eine erhebliche Wirkung erzielt werden kann. Wenn DN T-Zellen katalytisch wirken, d.h. während der Suppression selbst nicht verbraucht werden, könnte eine DN T-Suppressorzelle je nach Lebensdauer relativ viele Zielzellen supprimieren. Aktivierte T-Zellen zeichnen sich durch ihr exponentielles Wachstum aus. Die Suppression einiger weniger Zellen in der Anfangsphase der Immunantwort kann somit weitreichende Folgen für die Kinetik der Immunantwort haben. Dieses Verstärkungsphänomen wurde in der Versuchsanordnung in Abb. 22 experimentell ausgenutzt: Dadurch, dass eine einzige zytotoxische T-Zelle mehrere Zielzellen zu lysieren vermag, äußert sich die Suppression einiger weniger T-Zellen verstärkt.

Reife DC gelten als professionelle APC des Immunsystems (siehe Review [204]). Eine gegenläufige Funktion, die zur Suppression führt, wurde bisher nicht diskutiert. Die quantitativen Effekte des pMHC-Transfers *in vivo* sind unbekannt, und es muss offen bleiben, ob der Transfer von pMHC-Komplexen auf DN T-Zellen durch DC Bestandteil von Immunantworten ist. Eine mögliche biologische Funktion ist, dass reife DC auf

diesem Wege bereits während einer laufenden Immunantwort die in der Endphase der Immunantwort notwendige Apoptose-Induktion in T-Zellen einleiten können. In der Literatur ist ein Mausmodell beschrieben, in welchem Autoimmunität mit einer gestörten DC-Reifung und -Funktion einhergeht [205]. Eventuell ist an dieser Störung der Toleranzinduktion auch der verminderte pMHC-Transfer ursächlich beteiligt.

Der Transfer von pMHC-Komplexen wird auch durch unreife DC vermittelt, wie in Abb. 14 gezeigt werden konnte. In der Literatur ist beschrieben, dass unreife DC eine tolerogene Wirkung auf T-Zellen haben [206;207]: Im Kontakt mit DC können T-Zellen zu nicht-proliferierenden IL-10 produzierenden Zellen differenzieren. Durch ihre Fähigkeit, einen mäßigen Transfer von pMHC-Komplexen auf DN T-Zellen zu ermöglichen, nehmen unreife DC eine weitere suppressive Rolle ein. Ohne selbst an der Vermittlung der Suppression beteiligt zu sein, erweitern unreife DC durch die Abgabe von pMHC-Komplexen auf DN T-Zellen, welche die direkten Vermittler der Suppression sind, ihren "inhibitorischen Radius".

Bezüglich der *in vivo* Relevanz des pMHC-Transfers sollte auch die Menge transferierter pMHC-Komplexe angesprochen werden. In Quantifizierungsversuchen konnte eine Anzahl von etwa 1200 transferierten Molekülen nach 2 Tagen auf der Oberfläche der DN T-Zellen ermittelt werden (Abb. 17). Es ist zu vermuten, dass aufgrund der zahlenmäßigen Überlegenheit die bereits auf der Oberfläche vorhandenen pMHC-Komplexe als suppressive Strukturen eine größere Rolle spielen als transferierte pMHC-Komplexe. Werden hingegen stark immunogene pMHC-Komplexe transferiert, so kann diesen bei der Toleranzinduktion eine gesteigerte Rolle im Vergleich zu schwach-immunogenen Selbst-Antigen-MHC-Molekülen zukommen. Werden Fremd-Antigen-MHC-Komplexe auf Suppressorzellen transferiert, welche aus dem Prozessierungspathway von APC stammen (z.B. Antigene von Pathogenen), kann das Antigen eine prinzipielle Barriere überwinden und auf eine DN T-Zelle gelangen, was auf keinem anderen Wege möglich gewesen wäre.

Um die *in vivo*-Relevanz des pMHC-Transfers abzuschätzen, müssen außerdem noch weitere mögliche pMHC-Donoren wie Makrophagen und B-Zellen getestet werden. Außerdem müssen die klassischen T-Zell-Subpopulationen von T-Helfer- und Killerzellen auf die Fähigkeit, unspezifisch pMHC-Komplexe aufzunehmen, überprüft werden. Ein interessanter biologischer Aspekt ist auch, dass durch einen unspezifischen, unselektiven Transfer von pMHC-Komplexen das Peptid-MHC-Repertoire der Donorzelle auf der Empfängerzelle abgebildet wird. Das bedeutet, dass die Antigene vermutlich entsprechend ihrer Häufigkeit auf die Donorzelle transferiert werden. Damit ist die Suppressorfunktion der DN T-Zellen automatisch auf das Spektrum der jeweils "aktuellsten" Antigene fokussiert.

5.1.2 Interaktion von DC und DN T-Zellen

Im Hinblick auf die *in vivo* Relevanz der Antigen-spezifischen Suppression ergibt sich die interessante Frage, auf welche Weise sich DC und DN T-Zellen gegenseitig beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass DC die DN T-Zellen zur Suppression befähigen. Dies konnte einerseits durch den Nachweis der Funktionalität der transferierten pMHC-Komplexe (Abb. 19 und 20) belegt werden, zum anderen weisen auch die Befunde der allogenen und autologen Versuchsansätze in die selbe Richtung:

In allogenen Versuchsansätzen in Abschnitt 4.1.5.2 (S. 69, siehe Abb. 25) konnte gezeigt werden, dass DN T-Zellen, welche keine Verwandtschaft zu den Stimulatorzellen aufweisen, keine Veto-Aktivität haben und die Zytotoxizität alloreaktiver T-Zellen nicht supprimieren können. Werden die unverwandten DN T-Zellen jedoch in einer zweitägigen Vorkultur mit DC vom Stimulator-Typ koinkubiert, können diese DN T-Zellen eine Veto-Aktivität erwerben. Dieses Resultat könnte damit erklärt werden, dass es während der Vorkultur mit den DC zu einem Transfer von pMHC-Komplexen auf die DN T-Zellen kommt. Diese transferierten pMHC-Komplexe können nun von den DN T-Zellen genutzt werden, um in Interaktion mit den alloreaktiven T-Zellen zu treten. Damit ist dieses Resultat eine weitere funktionelle Bestätigung der Antikörperbindungsstudien, welche belegen, dass reife DC sehr gute pMHC-Donoren sind (vgl. Abb. 14).

Auch im autologen System ist eine Konditionierungskultur von DN T-Zellen mit autologen, Antigen-beladenen DC eine Voraussetzung für die Suppression. Dabei ist die Peptidbeladung der DC essentiell für die spätere Suppressorfunktion der DN T-Zellen (Abb. 27). Auch während dieser Konditionierungskultur kommt es mit großer Wahrscheinlichkeit zum Transfer von pMHC-Komplexen auf die DN T-Zellen.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht, ob der Zell-Zell-Kontakt zwischen DN T-Zelle und DC - abgesehen vom pMHC-Transfer - eine weitere Stimulation für DN T-Zellen darstellt. Eine denkbare Möglichkeit wären von reifen DC freigesetzte Zytokine wie z.B. IL-6 [208], welche direkt stimulierend auf DN T-Zellen wirken.

In der Literatur ist berichtet, dass DC Einfluss nehmen auf das Homing von T-Lymphozyten [209]. Es ist jedoch ungeklärt, inwiefern DC auch das Homing von regulatorischen DN T-Zellen beeinflussen können. Es ist denkbar, dass es bei der Kontaktaufnahme zwischen DC und DN-Zelle nicht nur zum Transfer von Antigen-MHC kommt, sondern auch eine Modulation der Expression von Homingfaktoren auf DN T-Zellen eingeleitet wird. Eine phänotypische Untersuchung der Chemokinrezeptoren humaner DN T-Zellen ist bereits projektiert. Aus phänotypischen Untersuchungen in Mausmodellen ist bereits bekannt, dass $\text{TCR}\gamma\delta^+$ T-Zellen bevorzugt in der zweiten, "abklingenden Phase" der Immunantwort an Orte der Inflammation wandern [79].

Ein stimulatorischer Einfluss in umgekehrter Richtung, von $\text{TCR}\gamma\delta$ DN T-Zellen auf DC, ist in der Literatur ebenfalls beschrieben [210]. Dabei begünstigen $\text{TCR}\gamma\delta$ T-Zellen die Reifung von DC. Ismaili et al. konnten zeigen, dass es durch eine Kokultur von $\text{TCR}\gamma\delta$ T-

Zellen mit DC zu einer Hochregulation von HLA-DR, CD86, CD83 auf autologen, monozytengereiften DC kommt [210]. Die Autoren führen den Effekt auf TNF zurück, da dieser mit einem anti-TNF- α -Antikörper blockierbar war. Wenn DN T-Zellen DC in Richtung eines reiferen Phänotyps treiben, können sie damit auch den pMHC-Transfer verbessern. In eigenen Zytokinmessungen von Überständen der TCR $\gamma\delta$ + DN T-Zell-Klone konnten jedoch auch nach Kontakt mit DC nur kleine Mengen von TNF- α detektiert werden (30 pg/ml; Abb. 9). Eventuell ist eine noch unklare Form der Voraktivierung von DN T-Zellen für die Sekretion von Zytokinen, welche Einfluss auf DC nehmen können, notwendig.

Von einem weiteren Standpunkt aus betrachtet können DC als die Grundlage der Suppression gelten: Durch die Stimulation mit DC werden T-Zellen adäquat stimuliert und aktiviert. In etlichen Versuchsansätzen konnte gezeigt werden, dass eine Sensibilität der T-Zellen für Suppression von der vorausgegangenen Stimulation abhängt [193;211]. Derzeit kann noch keine Aussage darüber gemacht werden, welche Eigenschaften CTL in den hier verwendeten Versuchsansätzen aufweisen müssen, um Antigen-spezifisch supprimierbar zu sein. In den gezeigten Versuchen wurden CTL verwendet, die alle mit demselben Expansionsprotokoll generiert wurden und deren Restimulation möglichst gleich lange (4 - 6 Tage) zurücklag. Dennoch wäre eine Analyse der Korrelation zwischen dem Zustand der T-Zelle und Supprimierbarkeit der T-Zelle interessant. Der Abstand zur letzten spezifischen Restimulation und die Zahl der spezifischen Restimulationen [211] könnten relevante Größen für die unterschiedliche Sensibilität der CTL gegenüber Antigen-spezifischer Suppression sein. In der Literatur gibt es außerdem Hinweise darauf, dass die Zell-Zyklus-Phase der T-Zellen eine wichtige Rolle für die TCR-vermittelte Apoptose spielt [212].

5.1.3 Suppression von alloreaktiven T-Zellen durch DN T-Zellen

Zunächst wurde untersucht, ob DN T-Zellen in der Lage sind, eine primäre MLR zu unterdrücken. Dabei wurde folgende Versuchsanordnung gewählt: CD4⁺ Zellen eines Spenders A wurden gegen DC von B gerichtet. Eine ansteigende Menge von DN T-Zellen von Spender A wurde zugegeben. Mittels ³H-Thymidin-Einbau wurde die Proliferation in den verschiedenen Ansätzen ermittelt. Die Effekte der Suppression durch DN T-Zellen waren jedoch sehr gering. Durch Zugabe von DN T-Zellen kam es höchstens zu einer Proliferationsinhibition von 30% (Abb. 21, blaue Balken). In den meisten Proliferationstests war zu beobachten, dass die leichte Proliferationsinhibition in den niedrigen Suppressor : Responder Verhältnissen ab 0,5 : 1 wieder rückläufig war. Dieser Effekt ist vermutlich auf eine Proliferation der DN T-Zellen und den damit verbundenen vermehrten Einbau von ³H-Thymidin in die Suppressorzellen selbst zurückzuführen.

Um eine echte "Veto-Aktivität" von DN T-Zellen nachzuweisen, wurde ein weiterer allogener Versuchsaufbau benutzt: MNC des Spenders A (Responderzellen) wurden mit

bestrahlten MNC des Spenders B stimuliert. Ansteigende Mengen TCR $\gamma\delta$ DN T-Zellen von Spender B wurden während der 6-tägigen MLR kokultiviert. Diese Versuchsanordnung wies eine wichtige Verbesserung auf: Statt der Proliferationsinhibition wurde hier die zytotoxische Kapazität der Responderzellen gegenüber Zielzellen des Spenders B ermittelt. Der Grund für das veränderte "Read-out-System" ist, dass die Suppression in einer Responderzellpopulation, die nur wenige Spender B-spezifische T-Zellen aufweist, schwierig zu detektieren ist. Aus diesem Grund wurde in diesem Versuch das Vermögen der Responderzellen ermittelt, Zielzellen von Spender B zu lysieren. Dadurch, dass eine einzige spezifische T-Zelle mehrere Zielzellen zu lysieren vermag, wird der Effekt der Suppression einer einzigen spezifischen T-Zelle verstärkt. Durch die Nutzung dieses Verstärkungseffekts konnte gezeigt werden, dass der Verwandtschaftsgrad zwischen Stimulatorzellen und Suppressorzellen von entscheidender Bedeutung für die Suppression ist (Abb. 23). Eine Suppression konnte nur dann ermittelt werden, wenn die Suppressorzellen vom selben Spender verwendet werden, von welchem auch die Stimulatorzellen stammen. Werden Suppressorzellen von einem unverwandten dritten Spender für die Versuche verwendet, so lässt sich keine Suppression nachweisen. Eine genetische Verwandtschaft zwischen Suppressorzellen und Responderzellen scheint tendentiell eher unwichtig zu sein, wurde jedoch nicht systematisch untersucht.

Insgesamt zeigen diese Resultate der gemischten Lymphozytenreaktion, dass aus Vollblut isolierte TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen zu einer Veto-Aktivität gegenüber Stimulator-Zell-reaktiven T-Zellen im Stande sind. Ähnliche Effekte konnten neben verschiedenen anderen Zellpopulationen [100-102] bereits für Phospholigand-aktivierte TCR $\gamma\delta$ Zellen [103] sowie für modifizierte, transgene TCR-CD4-CD8⁻ T-Zellen gezeigt werden [213].

Zur weiteren Untersuchung der Suppressorfunktion von DN T-Zellen wurde ein zusätzlicher allogener Versuchsansatz entwickelt: Da DC in der Lage sind, Suppressorfunktion zu vermitteln, sollte überprüft werden, ob die Veto-Aktivität auch erworben werden kann. Hierfür wurden TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen eines unverwandten, dritten Spenders, welche normalerweise keine Suppressorzellen sind (vgl. Abb. 23) in einer Vorkultur mit DC vom Stimulator-Typ inkubiert. Diese konditionierten DN T-Zellen wurden am Ende der Vorkultur fluoreszenzsortiert und anschließend wie die unkonditionierten T-Zellen im Verhältnis 1,5 : 1 mit den Responderzellen inkubiert, um deren suppressorische Funktion zu testen. Schließlich wurden die Responderzellen auf ihre lytische Aktivität gegenüber PHA-Blasten vom Stimulator-Typ überprüft (Versuchsaufbau Abb. 24). Das Resultat bestätigte die Ergebnisse der vorherigen Versuchsserie: Nur diejenigen TCR $\gamma\delta$ DN T-Zellen von Spender C (unverwandter, dritter Spender), die mit DC vom Stimulator-Typ konditioniert wurden, sind in der Lage, die lytische Aktivität in der Responder-Zell-Population zu verringern, während unkonditionierte TCR $\gamma\delta$ DN T-Zellen von Spender C keine Suppression ausüben können.

Diese Resultate deuten darauf hin, dass es in diesem Ansatz zu einem Transfer von pMHC-Komplexen von DC auf die TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zellen des unverwandten, dritten Spenders gekommen ist. Erst dadurch werden diese Zellen zu Suppressorzellen. Außerdem ist dieser Befund ein weiterer Hinweis darauf, dass nur jene T-Zellen, die pMHC-Komplexe von Spender B tragen, in Interaktion mit den Responderzellen treten können und Suppression vermitteln. Neben den Antikörperbindungsstudien (Abb. 14) ist dies ein weiterer funktioneller Nachweis dafür, dass DC gute pMHC-Donoren sind. Ferner unterstützen diese Daten die in Abb. 19 und 20 aufgestellte These, dass die übertragenen pMHC-Moleküle (oder zumindest ein Teil davon) funktionell aktiv sind. In diesen Versuchen konnte also gezeigt werden, dass die Erlangung von Veto-Aktivität durch eine Vorkultur mit DC des Stimulator-Typs möglich ist, was ein weiterer starker Hinweis darauf ist, dass pMHC-Komplexe vom Stimulator-Typ die Schlüsselmoleküle des Veto-Effektes sind.

5.1.4 Apoptose-Induktion von Antigen-spezifischen CTL durch autologe DN T-Zellen

Die Arbeitshypothese über die regulatorische Eigenschaft von DN T-Zellen postuliert, dass DN T-Zellen MHC-Komplexe zur Suppression von aktivierten T-Zellen einsetzen. Der Nachweis dafür wurde in den allogenen Versuchsansätzen erbracht. Ein besonders wichtiger Punkt ist jedoch der Nachweis der Antigenspezifität der Suppression durch DN T-Zellen. Hierfür wurde ein autologes Read-out-System entworfen, in dem die Antigen-spezifische Suppression von DN T-Zellen nachgewiesen werden kann (siehe Abb. 26). Alle Zellen, die in diesen Versuchsansätzen verwendet wurden, stammen von demselben Spender.

In einem ersten Schritt wurden Antigen-spezifische CTL eines Spenders über 2 - 6 Wochen nach einem etablierten Protokoll [214] expandiert (Abb. 26 A). Diese spezifischen T-Zellen dienten beim späteren Apoptose-Test als Zielzellen. Als Effektorzellen wurden DN T-Zellen desselben Spenders verwendet, welche mit autologen, Antigen-beladenen DC konditioniert wurden (Modell siehe Abb. 26 B). Es wurde die Fähigkeit der DN T-Zellen untersucht, Apoptose in Antigen-spezifischen CTL zu induzieren. Die Ermittlung des Zellschadens gerade innerhalb der spezifischen CTL ist dabei von besonderem Interesse. Aus diesem Grund wurde eine Peptid-MHC-Tetramer-Färbung durchgeführt. Die durchflusszytometrische Ermittlung der Peptid-MHC-Tetramer-positiven Zellen birgt jedoch Schwierigkeiten: Wie aus der Literatur bekannt ist [193] und in eigenen Versuchen verifiziert werden konnte, kommt es bei Antigen-spezifischem Kontakt auf der CTL zu einer Herunterregulation des TCR (siehe Abb. 28 B, rechte Spalte). Dadurch sind die CTL (Zielzellen), wenn sie im Apoptose-Test supprimiert werden, nicht mehr als Antigen-spezifische Zellen identifizierbar, da keine Peptid-MHC-Tetramer-Bindung an den TCR mehr möglich ist. Eine Peptid-MHC-Tetramerfärbung vor dem Apoptose-Test kann zwar

diesen Effekt weitgehend verhindern, interferiert jedoch mit dem suppressiven Effekt (siehe Abb. 28 A und B) und stellt daher keine Lösung des Problems dar. Als Alternative wurde stattdessen derjenige Anteil der Peptid-Tetramer-positiven CTL herangezogen, der vital ist. Die Methode, die Abnahme vitaler Zellen zu ermitteln, liefert keine artifiziell überhöhten Werte und ist eine konservative Abschätzung des Effektes. In jedem Fall ist die Bestimmung des Anteils vitaler Zellen an den Peptid-MHC-Tetramer-positiven Zellen exakter als die Messung apoptotischer Zellen, die stark von dem Verlust des TCR verfälscht wird (Berechnung siehe Anhang; Abschnitt 6.1.1).

Die Resultate der Suppressionstests zeigen deutlich, dass sowohl $\text{TCR}\gamma\delta^+$ (Abb. 27) als auch $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen in der Lage sind, Apoptose in Antigen-spezifischen CTL zu induzieren (Abb. 31). Dabei ergeben sich zwei sehr wichtige Resultate, welche die Ergebnisse der allogenen Versuchsansätze bestätigen:

Zunächst wird die wichtige Rolle der DC für die Konditionierung von DN T-Zellen als Voraussetzung für die Suppression bestätigt. Werden die DN-T-Zellen mit DC konditioniert, welche mit dem adäquaten Peptid beladen wurden, so führen die DN T-Zellen beim Kontakt mit CTL zu einer starken Abnahme vitaler Zellen. Werden dagegen in der Vorkultur DC verwendet, die mit einem irrelevanten Peptid beladen wurden, bleiben die Zellen vital. Es ist davon auszugehen, dass auch während der Konditionierungskultur zwischen DN T-Zellen und autologen, Antigen-beladenen DC ein pMHC-Transfer stattfindet. Ob über einen möglichen pMHC-Transfer hinaus noch eine weitere Stimulation vermittelt wird, ist unklar.

Ein weiteres sehr wichtiges Resultat der autologen Ansätze ist die Antigenspezifität der Suppression. Es ergeben sich mehrere direkte Hinweise auf eine Antigen-spezifische Suppressorfunktion der konditionierten DN T-Zellen:

Erstens, es können nur solche DN T-Zellen Suppression vermitteln, welche aus einer Konditionierungskultur mit DC stammen, die mit dem adäquaten Peptid beladen wurden. Werden die DC mit einem irrelevanten Peptid beladen, können die DN T-Zellen nicht zu Suppressorzellen konditioniert werden. Damit bestätigt sich die Hypothese, dass nur pMHC-Komplexe mit dem spezifischen Peptid Suppression vermitteln können (Abb. 27 A unten; Abb. 31 A). Auch die Zunahme CD8^{low} exprimierender Melan-A-spezifischer CTL (Abb. 29 B), ein bekanntes Zeichen von Apoptose in T-Zellen (unveröffentlichte Daten A. Mackensen, Uniklinikum Regensburg), findet nur dann statt, wenn DN T-Zellen als Suppressorzellen eingesetzt werden, die aus einer Konditionierungskultur mit Melan-A-beladenen DC stammen.

Zweitens, die Antigenspezifität kann auch auf der Seite der Zielzellen (CTL) nachgewiesen werden. Wird der Zellschaden in den TM^- unspezifischen CTL nach dem Apoptose-Test bestimmt, so findet man, dass es zu keiner Zunahme der apoptotischen Zellen kommt (Abb. 30). Dies ist ein indirekter Hinweis darauf, dass die Expression des adäquaten TCR eine Voraussetzung für die Apoptose-Induktion von Zielzellen ist. Nur

durch eine Kontaktaufnahme mit dem spezifischen pMHC-Komplex können die CTL apoptotisch werden.

Drittens, der Prozess der Antigen-spezifischen Suppression vollzieht sich rasch und kann nach vier Stunden im Apoptose-Test detektiert werden (vgl. Abb. 33). Zur Detektion der Apoptose wurde AnnexinV eingesetzt, welches sehr effektiv an Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran bindet. Das Vorkommen von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran sowie weitere Hinweise auf den Verlust der normalen Membranarchitektur sind ein früher Marker für Apoptose [215]. Nach außen gekehrte Phosphatidylserine, welche bei vitalen Zellen nur auf der Innenseite der Plasmamembran vorkommen, sind eine Erkennungsstruktur für Makrophagen und leiten deren phagozytotische Aktivität ein [216]. Dieser Befund einer sehr schnellen Antigen-Erkennung ist in Übereinstimmung mit den Daten aus der Literatur, wonach die Antigen-spezifische Kontaktaufnahme zwischen TCR und pMHC innerhalb von Minuten vonstatten geht [35] und Effektor $CD8^+$ Zellen bereits eine Stunde nach Antigen-spezifischer Kontaktaufnahme die Proliferation einleiten [193].

Die Inkubationsdauer des Apoptose-Tests wurde auf 4 h begrenzt, da sich in Vorversuchen (nicht dargestellt) herausgestellt hat, dass eine Inkubationszeit von 13 h in T-Zell-Medium die Spontanapoptose der spezifischen T-Zellen erhöht. Dies ist ein bekanntes Phänomen in der Literatur (siehe z.B. [217]). Auf eine Zugabe von Zytokinen während des Apoptose-Tests wurde jedoch verzichtet, da Zytokine in die Balance zwischen Suppression und Aktivierung eingreifen können [218]. In Vergleichsversuchen zur Inkubationszeit des Apoptose-Tests zeigte sich, dass bereits nach 4 h die gesamte Apoptose-Induktion detektiert werden kann. Nach insgesamt 13 h nehmen die vitalen Zellen nicht noch weiter ab (Abb. 33 rote Linien). Der scheinbare Anstieg vitaler Annexin-negativer Zellen in denjenigen Ansätzen, in welchen nach 13 h Inkubationszeit keine Suppression stattfindet (Abb. 33, offene Kästchen) geht möglicherweise darauf zurück, dass DN T-Zellen durch die kontinuierliche Expression löslicher Faktoren wie $IFN-\gamma$ (siehe Abb. 9) die Spontanapoptose der CTL in T-Zell-Medium verhindern können.

Ein weiteres Argument sprach für eine Inkubationszeit von 4 h im Apoptose-Test: In eigenen Versuchen zur lytischen Aktivität von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen in parallelen Ansätzen im ^{51}Cr -Freisetzungstest und einem Apoptose-Test (PKH26-Test) mit AnnexinV konnte gezeigt werden, dass eine ausgezeichnete Korrelation zwischen diesen beiden Zytotoxizitätstests vor allem in den ersten Stunden nach dem spezifischen Kontakt existiert (Abb. 43 B und siehe auch [194]). Dies zeigt, dass AnnexinV ein guter Marker für die frühen apoptotischen Prozesse im Zusammenhang mit Antigen-spezifischer Erkennung ist.

5.1.5 Mechanismen der DN T-Zell-vermittelten Suppression

Zur Aufklärung der Mechanismen der Antigen-spezifischen Suppression durch DN T-Zellen wurden Blockadeexperimente mit $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen durchgeführt.

Eine Beteiligung des Perforin/Granzyme-Signalweges kann aufgrund funktioneller Untersuchungen an $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen ausgeschlossen werden. Hierfür wurde Concanamycin-A (CMA) eingesetzt, ein sehr potenter Inhibitor des Perforin-Signalweges. Aufgrund einer pH-Wert-Erhöhung in sauren Vesikeln kommt es zu einer beschleunigten Degradation von Perforin. In einer Positivkontrolle mit zytotoxischen T-Zellen inhibiert CMA sehr effizient die Perforin/Granzyme-vermittelte Zielzell-Lyse (siehe Abb. 34, B). Im Apoptose-Test mit DN T-Zellen führte jedoch eine Zugabe von CMA zu keiner Inhibition (Abb. 34 A).

Weiter wurde die Beteiligung von Todesrezeptoren an der Apoptose-Induktion funktionell untersucht. Dabei wurde zunächst das Rezeptorpaar Fas/FasL, der meistbeschriebene Signalweg des "Aktivierungsinduzierten Zelltods" (AICD) (siehe Reviews [135;137]), betrachtet. Hierzu wurden Apoptose-Tests mit $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen als Effektorzellen und CTL als Zielzellen durchgeführt, welche mit einem neutralisierenden anti-Fas Antikörper vorbehandelt worden waren. Es ist das Phänomen bekannt, dass CTL nach spezifischer Antigen-Erkennung über den Fas/FasL Signalweg apoptotisch werden, dabei jedoch nicht das FasL auf der Zielzelle die Hauptrolle spielt, sondern auf benachbarten CTL (Fratricide) [156]. Zur Blockierung wurde deshalb nicht ein anti-FasL-Antikörper auf den Suppressorzellen, sondern ein anti-Fas-Antikörper auf den CTL eingesetzt. Damit kann jegliche mögliche FasL vermittelte Apoptose-Induktion unterbunden werden. Dennoch konnte in keinem der Experimente eine Inhibition der Apoptose-Induktion durch DN T-Zellen erreicht werden. Aus diesem Grunde scheint eine Beteiligung des Rezeptorpaares Fas/FasL für die Antigen-spezifische Suppression bei DN T-Zellen sehr unwahrscheinlich.

Außerdem wurde die intrazelluläre Perforin- und GranzymeB-Expression mittels Antikörpern untersucht. Für diese Versuche wurden aus technischen Gründen zunächst nur $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen verwendet. Die Färbungen müssen für $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen in zukünftigen Experimenten wiederholt werden. Hierbei ergab sich, dass, ähnlich wie in unstimulierten und stimulierten CD8^+ T-Zellen (Abb. 35 B), auch in $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen Perforin vorliegt (Abb. 35 A), dass intrazellulär jedoch kein GranzymeB vorliegt, welches als eines der Haupteffektormoleküle der Granzyme-vermittelten Apoptose bekannt ist [219;220]. Im Gegensatz dazu besitzen zytotoxische CD8^+ CTL, welche zur Zielzell-Lyse über den Perforin/ Granzyme-Weg in der Lage sind, intrazellulär große Mengen von GranzymeB (Abb. 35 B unten). $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen ähneln in dieser Hinsicht also eher unstimulierten, naiven CD8^+ T-Zellen, welche ebenfalls kein GranzymeB aufweisen (Abb. 35 B oben).

Auch für FasL wurde mit TCR $\gamma\delta^+$ und TCR $\alpha\beta^+$ DN T-Zellen ein phänotypischer Nachweis über Antikörperbindung durchgeführt. Die Untersuchung von membranständigem FasL ist jedoch in der Literatur nicht unumstritten (siehe Einleitung 2.2.4., S. 23 f.). Dies beruht vor allem darauf, dass viele anti-Fas-Antikörper unspezifisch agieren, und dass etliche Zelltypen zu einer Abspaltung von FasL von der Zelloberfläche neigen. Aus diesem Grunde wurde in den hier gezeigten Versuchen eine enzymatische Verstärkungsmethode zum phänotypischen Nachweis von FasL angewandt. Mit dieser Methode ist es möglich, auch kleine Molekülmengen im Durchflusszytometer darzustellen. Trotz der hohen Sensitivität der Methode konnten keine FasL-Moleküle auf der Zelloberfläche der DN T-Zellen nachgewiesen werden.

Die Daten dieses Abschnitts weisen darauf hin, dass der meistbeschriebene Todesrezeptor für AICD in die Apoptose-Induktion durch DN T-Zellen nicht involviert ist. Diese Ergebnisse stehen ferner in Widerspruch zu den Ergebnissen für murine DN T-Zellen, deren Suppressorfunktion über den Fas/FasL-Signalweg abläuft [28]. Funktionelle Untersuchungen zu einer TNF-vermittelten Apoptose-Induktion stehen noch aus.

Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass Fas/FasL- und Perforin-unabhängige Apoptosewege bei der Veto-Funktion von Knochenmarkszellen beteiligt sind [221]. Die Autoren konnten im Mausmodell zeigen, dass aktivierte Knochenmarkszellen, die zu einer starken Veto-Aktivität von Antigen-spezifischen T-Zellen in der Lage sind, ihren Veto-Effekt innerhalb von 8 h ausüben und dabei - wie in Knockout-Modellen gezeigt werden konnte - kein Fas/FasL oder Perforin involviert ist. In einem von diesen Autoren benutzten Modell war das Fas-Gen sowohl auf den Veto-Zellen als auch auf den Responderzellen ausgeknockt, so dass weder eine Fas-vermittelte Apoptose-Induktion über die Suppressorzellen noch über benachbarte Bruderzellen in Frage kommt [221]. Diese Daten aus der Literatur beweisen, dass es neben Fas/FasL und Perforin Antigen-spezifische Deletionsmechanismen geben muss. Die Untersuchung des Mechanismus der Antigen-spezifischen Suppression durch DN T-Zellen wird eines der Hauptziele für zukünftige Versuche sein. Um den Mechanismus ausführlich studieren zu können, wurde ein Modellsystem für Antigen-spezifische Suppression mit T2 Zellen etabliert, welches in Abschnitt 5.2 diskutiert wird. Hier werden auch Apoptose-Induktionswege ohne Suppressorzell-ständige Todesrezeptoren (lösliche Todesrezeptoren oder auf Bruder-T-Zellen vorhandene Todesrezeptoren) und die Dauer des Antigen-Kontaktes als Parameter für Antigen-spezifische Apoptose-Induktion diskutiert.

5.1.6 DN T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen

DN T-Zellen haben, wie in den Abschnitten 4.1.5 und 4.1.6 gezeigt werden konnte, *in vitro* eine immunregulatorische Funktion. Die Rolle regulatorischer T-Zellen ist bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen von besonderem Interesse, da es bei diesen Erkrankungen zu deregulierten Immunreaktionen gegen Selbstantigene kommt. Aus diesem Grund

wurde peripheres Blut von Patienten mit verschiedenen unbehandelten Autoimmunerkrankungen (Rheumatoide Arthritis, Sjögren Syndrom, Lupus erythematoses, Diabetes mellitus Typ-I und Multiple Sklerose) phänotypisch analysiert. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob einerseits die Frequenzen von DN T-Zellen und ihren Subpopulationen im Blut von Autoimmunpatienten genauso hoch sind wie in gesunden Kontrollspendern. Andererseits sollten phänotypische Unterschiede zwischen den DN T-Zellen der Patienten und der gesunden Kontrollen ermittelt werden.

Eingeschlossen in die Untersuchungen wurden Proben von 22 unbehandelten Patienten mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen. Da eine immunsuppressive Therapie (z.B. mit Steroiden) zur Verfälschung der zu ermittelnden Parameter führen kann, wurden vorbehandelte Patienten aus der Untersuchung ausgeschlossen. Die Proben wurden jeweils am Entnahmetag gefärbt, nach den verschiedenen Erkrankungsarten ausgewertet und mit 18 gesunden Spendern verglichen.

Die erste Fragestellung war, ob Patienten mit Autoimmunerkrankungen eine verringerte Frequenz von DN T-Zellen aufweisen. Diese Frage muss vor allem aus zwei Gründen vorsichtig beantwortet werden: Zum einen aufgrund der niedrigen Probenzahlen innerhalb jeder Erkrankungsart, und zum anderen aufgrund der hohen Streuung innerhalb der Kontrollgruppe. Für die Patienten mit rheumatoider Arthritis scheinen sich tendentiell weniger DN T-Zellen innerhalb der CD3⁺ Population zu befinden (siehe Abb. 39 A). Dabei ist der Anteil von TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen (siehe Abb. 39 C) stärker reduziert als der Anteil von TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN T-Zellen (Abb. 39 B). Auffällig ist, dass die hohen Werte für DN T-Zellen innerhalb der CD3⁺ Lymphozyten, welche in der Kontrollgruppe detektiert wurden, von den Patienten, unabhängig von der Erkrankungsform, nicht erreicht wurden (siehe Abb. 39 A). Es ist unklar, weshalb die Patienten verringerte DN T-Zell-Frequenzen aufweisen. Bei Rheumatoide Arthritis-Patienten gelangten Liu et al. zu ähnlichen Resultaten: Während der Anteil an TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN T-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation bei den Patienten keinen Unterschied zwischen Patienten und Spendern ergab, zeigten sich Unterschiede in der Frequenz der TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen: Die Frequenz von TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen im peripheren Blut von Patienten ist signifikant verringert, wohingegen der Gehalt an TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen am Entzündungsort, der Synovialflüssigkeit, signifikant erhöht war im Vergleich zum Gehalt dieser Zellen im peripheren Blut von Patienten und Spendern [222]. Auszuschließen ist nicht, dass eine Überrepräsentation von anderen Immunzellen wie z.B. CD4⁺ T-Helferzellen (vgl. Abb. 38 A) daran beteiligt ist und es auf Grund des starken Aktivierungszustandes zu einer Art Verdrängung von DN T-Zellen aus dem T-Zell-Pool kommt. Dass insgesamt im peripheren Blut ein anderer immunologischer Aktivierungszustand in den Patienten (aller getesteten Autoimmunerkrankungen) vorliegt, wird daraus deutlich, dass vermehrt CD4⁺ und verringert CD8⁺ T-Zellen vorkommen, und dass CD56⁺ NK-Zellen und CD4⁺CD25⁺ Zellen überrepräsentiert vorliegen (vgl. Abb. 38 A - D).

Weiter wurde das Expressionsmuster von CD45 auf DN T-Zellen von Patienten und Spendern analysiert: CD45 kommt in verschiedenen Isoformen vor. Die verschiedenen Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen der Exons, welche die extrazelluläre Domäne von CD45 kodieren. Bei T-Gedächtniszellen entstehen Isoformen (CD45RO), welche sich mit dem TCR und den akzessorischen Molekülen zusammenlagern und die Antigenerkennung erleichtern [223]. Naive T-Zellen dagegen exprimieren eine Isoform (CD45RA), welche nicht mit dem TCR und den akzessorischen Molekülen assoziiert.

Bei den Patienten mit Autoimmunerkrankungen fiel nun ein verändertes Expressionsmuster von CD45RA und CD45RO auf den DN T-Zellen auf (Abb. 40 A und B): Patienten sämtlicher Autoimmunerkrankungen weisen eine erhöhte Frequenz von CD45RA⁺ DN T-Zellen (naiver Phänotyp) und eine verminderte Frequenz von CD45RO⁺ (Effektor-Phänotyp) DN T-Zellen auf. Bei weiterer Eingrenzung der untersuchten Zellen fällt auf, dass dieser Trend vor allem auf die CD3^{high} Population zurückgeht (siehe Abb. 41 C und D).

In der Kontrollgruppe jedoch exprimieren die CD3^{high} DN T-Zellen nur zu ca. 10% CD45RA, wobei der größte Anteil der Zellen (ca. 90%) CD45RO-positiv ist. Dieser Befund stimmt mit Daten einer kürzlich publizierten Arbeit überein, in der gezeigt werden konnte, dass die Mehrzahl der V γ 9/V δ 2 TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen, der größten TCR $\gamma\delta$ -Zell-Subpopulation, positiv für CD45RO ist [224]. Dieser Phänotyp, von CD45RO⁺, CD95⁺, CCR7⁻ TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen, so vermuten die Autoren, entsteht im gesunden Individuum durch die kontinuierliche Stimulation mit bakteriellen Antigenen von Kindheit an. Die Autoren konnten außerdem zeigen, dass CD45RO⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen eine starke Expression von CCR5 aufweisen und zu den "erfahrenen" T-Zellen zu zählen sind, die möglicherweise ihren Phänotyp aufgrund des kontinuierlichen Kontakts mit bakteriellen Antigenen erworben haben.

Für die Patienten liegen jedoch die Werte für CD45RO in der CD3^{high} DN T-Zell Population durchwegs unter dem Median der gesunden Kontrollen (auch bis zu 50%). Da aus den phänotypischen Analysen ersichtlich ist, dass die CD3^{high}DN T-Zell-Population vorwiegend aus TCR $\gamma\delta$ ⁺ Zellen besteht (siehe Abb. 4), kann man schließen, dass die TCR $\gamma\delta$ ⁺DN T-Zellen von Patienten mit Autoimmunerkrankungen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen einen eher naiven Phänotyp aufweisen.

Ob die tendentiell verminderte Frequenz von TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen und das Auftreten dieser Zellen in einem eher "naiven" Phänotyp ursächlich an der Entstehung und Manifestation der Erkrankungen beteiligt sind, muss an dieser Stelle weiterhin offenbleiben. Es gibt Hinweise darauf, dass die TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen von Patienten mit Sjögren Syndrom auch funktionelle Beeinträchtigungen haben [225], wie z.B. eine schwache proliferative Kapazität nach anti-CD3 Stimulation und eine gestörte IL-2 Produktion im Vergleich zu gesunden TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen. Ein zukünftiges Ziel ist, die regulatorische Funktion von TCR $\gamma\delta$ ⁺ DN T-Zellen, isoliert aus Patienten mit

Autoimmunerkrankungen, zu analysieren. Dies kann ein erster Schritt sein, die gestörte Toleranzinduktion bei den Patienten zu verstehen.

Die charakterisierten Subpopulationen von Immunzellen spiegeln nur den Zustand des peripheren Blutes wieder, auf die Situation in den betroffenen Organen kann daraus jedoch nicht geschlossen werden. Eine verringerte $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zell-Population im peripheren Blut kann auch eine Abwanderung in die betroffenen Organe bedeuten. Dies vermuten auch Liu et al., welche im direkten Vergleich zwischen Synovialflüssigkeit und peripherem Blut von Patienten mit rheumatoider Arthritis eine signifikante Erhöhung von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen in der Synovialflüssigkeit gefunden haben [222]. Ähnliche Beobachtungen konnten für Multiple Sklerose gemacht werden: Hier kommt es zur Rekrutierung von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen in demyelinisierte Areale [226].

Zusammenfassend für die Analysen des peripheren Blutes von Patienten mit unbehandelten Autoimmunerkrankungen kann festgestellt werden, dass *in vivo* Abweichungen in der $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zell-Population scheinbar enger mit der Krankheit und ihren Symptomen korrelieren als in $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen. Auffallend ist diesbezüglich vor allem die leicht verringerte Frequenz der $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen im peripheren Blut und ein stark naiver Phänotyp dieser Zellen. Eine weiterführende Phänotypisierung der DN T-Zellen muss sich auf Aktivierungsgrad und Funktion von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen konzentrieren. Ferner müssen weitere Proben erfasst werden, um zu signifikanten Aussagen über die verschiedenen Parameter in den einzelnen Erkrankungsformen zu gelangen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigen, dass eine eingehende Untersuchung der erfassten Parameter in einer größeren Patienten- und Spenderpopulation wertvolle Hinweise zum Immunstatus bei Autoimmunerkrankungen geben wird.

5.1.7 Vergleich von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ und $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen

Phänotypische Analysen gesunder Spenderzellen im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass sich humane DN T-Zellen in $\text{TCR}\gamma\delta^+$ (80%) und $\text{TCR}\alpha\beta^+$ (20%) DN T-Zellen aufgliedern lassen. Beide Subpopulationen wurden für die phänotypischen und funktionellen Untersuchungen entweder *ex vivo* fluoreszenzsortiert oder kloniert. Obwohl es für $\text{TCR}\gamma\delta^+$ Zellen viele Expansions- und Stimulationsprotokolle gibt, wurde in der vorliegenden Arbeit darauf verzichtet, die $\text{TCR}\gamma\delta^+$ Zellen mit Phospholiganden (z.B. mit Monoethylphosphat [MEP] oder Isopentenyl-Diphosphat [IPP]) zu behandeln, da unklar ist, wie sich eine Phospholigandenstimulation auf die Suppressoraktivität von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ Zellen auswirkt. Über die verschiedenen Aufreinigungsmethoden der beiden Subpopulationen lässt sich folgendes konstatieren:

Die *ex vivo* Aufreinigung von DN-T-Zellen anhand des Fluoreszenzsortierers erwies sich als durchführbar, jedoch waren die Ausbeuten von DN T-Zellen sehr niedrig (ca. 15%). Trotz der Verwendung von Zellen einer gesamten Blutspende-Sitzung (Leukapheresat

bzw. buffy coat) konnten aufgrund der niedrigen Zellzahlen die Tests oftmals nicht in geplantem Umfang durchgeführt werden.

Für $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen ist die effektivste Anreicherungsmethode eine rein magnetische Isolierung (nach dem Miltenyi-System, siehe Abb. 6) mit etwa 60% Ausbeute. Da für diese Isolierungsmethode T-Zell-Fractionen aus der Elutriation verwendet wurden, kam es zu keiner Mitanreicherung von Monozyten, die oftmals unspezifisch Antikörper binden und in Positivanreicherungsprotokollen problematisch sein können. Die Reinheit der magnetisch angereicherten $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen lag mit 94% $\text{TCR}\gamma\delta^+$ bzw. 91% $\text{CD4}^- \text{CD8}^-$ Zellen zwar geringfügig unter der Reinheit der fluoreszenzsortierten $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen (98%), war jedoch ausreichend für die hier gezeigten Funktionsanalysen. Wegen der besseren Verfügbarkeit dieser Zellpopulation (siehe Abb. 3) wurden einige Versuche dieser Arbeit bisher ausschließlich mit $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen durchgeführt.

Für $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen hingegen steht ein ausschließlich magnetisches Aufreinigungsverfahren derzeit nicht zur Verfügung. Ferner sind die Ausbeuten bei den $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen aus der Fluoreszenzaufreinigung nur selten ausreichend für Funktionstests. Aus diesem Grund ist die Generierung von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zell-Klonen (siehe Abb. 7) die Grundvoraussetzung dafür, mit dieser humanen Subpopulation experimentell arbeiten zu können. $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen expandierten unter Anwendung des beschriebenen Klonierungsprotokolls (Abschnitt 3.2.19) über mehrere Wochen. Die allogenen Versuchsansätze zur Veto-Aktivität (Abschnitt 4.1.5.2) wurden bisher ausschließlich mit $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen durchgeführt, da eine Verwendung von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ in diesen allogenen Versuchsansätzen eine Klonierung dieser Zellen von etlichen verschiedenen Spendern verlangen würde.

Ein wichtiger Befund dieser Arbeit ist nun, dass es offenbar große funktionelle Parallelen zwischen $\text{TCR}\alpha\beta^+$ und $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen gibt. Das Fehlen der Korezeptoren CD4 und CD8 ist das offensichtlichste gemeinsame Merkmal, welches die Zellen für eine Funktion unabhängig von Antigenerkennung und der klassischen T-Zell-Aktivierung prädestiniert. Wie im Abschnitt zum Transfer von pMHC-Komplexen gezeigt werden konnte, können beide Subpopulationen pMHC-Komplexe von APC aufnehmen und auf ihrer Oberfläche präsentieren (Abb. 12). Unterschiede in der Effizienz der Aufnahme von pMHC-Komplexen müssen durch weitere Experimente herausgearbeitet werden.

Auch in der Suppressoraktivität von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ und $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen gibt es starke Gemeinsamkeiten: Die Arbeitshypothese dieser Arbeit impliziert, dass der TCR für die Ausübung der suppressiven Funktion keine Rolle spielt, da die pMHC-Komplexe als spezifische Effektormoleküle fungieren. $\text{TCR}\alpha\beta^+$ und $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen exprimieren zwar eine unterschiedliche Art von TCR, was jedoch für die Ausübung der Suppressorfunktion vermutlich nicht relevant ist. In vielen bisherigen Veröffentlichungen über die Funktionen von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ T-Zellen wurden Aspekte ihrer Eigenschaften in den Vordergrund gestellt, die sie von anderen T-Zell-Subpopulationen abgrenzen (Review

[227]). In dieser Arbeit hingegen wurden Funktionen von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen charakterisiert, welche sie mit den Funktionen von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen verbinden: Es konnte gezeigt werden, dass $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen sehr effizient ihre Oberflächen-MHC-I-Moleküle einsetzen können, um Apoptose in Antigen-spezifischen CTL zu induzieren. Dies wurde sowohl in allogenen Ansätzen (z.B. Abb. 23) als auch im autologen Antigen-spezifischen System gezeigt (siehe Abb. 27 und Abb. 29). Im autologen System konnte diese Funktion auch für $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 31). Der Einsatz von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen in allogenen Versuchsansätzen wurde bisher nicht durchgeführt.

Beide T-Zell-Subpopulationen sind also in der Lage, mit derselben Kinetik Apoptose in Antigen-spezifischen CD8^+ CTL zu induzieren. Diese Suppressorfunktion konnte für beide Subpopulationen von DN T-Zellen als *Antigen-spezifisch* identifiziert werden (vgl. Abb. 27 und 31). Der Mechanismus, der in die Apoptose-Induktion beider Subpopulationen involviert ist, ist derzeit noch unklar. Für $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen konnte in funktionellen Untersuchungen der Granzyme/Perforin Signalweg sicher ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich ist auch Fas/FasLigand nicht beteiligt an der Signaltransduktion. Für die $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen müssen diese funktionellen Befunde noch bestätigt werden.

Eine weitere Gemeinsamkeit der beiden Subpopulationen ist die Zytokinsekretion während des Suppressionstests. Die Überstände, welche den autologen Suppressionstests entnommen wurden (Abb. 32), zeigen, dass in den Suppressionstests mit $\text{TCR}\alpha\beta^+$ und $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen ein sehr ähnliches Muster der Zytokinsekretion auftritt. Folgende Reihung der Zytokine nach sezernierter Absolutmenge wurde detektiert: $\text{IFN-}\gamma \gg \text{IL-5} > \text{IL-4} > \text{TNF}\alpha > \text{IL-2}$. In Suppressionstests beider Subpopulationen spielt $\text{IFN-}\gamma$ die wichtigste Rolle (vgl. Abb. 32 A und B). Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, dass der untersuchte Suppressionseffekt bei beiden Subpopulationen möglicherweise auf denselben Mechanismus zurückgeht.

Wie bereits unter 5.1.6. erwähnt, scheinen die Abweichungen der DN T-Zell-Populationen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen bei $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen gravierender zu sein als bei $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen. Möglicherweise liegt dieser Unterschied zwischen $\text{TCR}\gamma\delta^+$ und $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen in unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften der beiden Subpopulationen begründet, wie z.B. in Unterschieden der Wachstumskinetik oder der Expression von Homing-Faktoren. Unterschiedliches Migrationsverhalten von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ und $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen konnte von Liu et al. bei Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden: An Entzündungsorten befindet sich im Vergleich zum peripheren Blut der Patienten zwar eine signifikant erhöhte Frequenz von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ DN T-Zellen, jedoch keine erhöhte Frequenz von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ DN T-Zellen [222].

5.2 Modellsystem für Antigen-spezifische T-Zell-Suppression auf der Basis der T2 Zelllinie

5.2.1 Apoptose-Induktion und retrograde Apoptose-Induktion durch T2 Zellen

Im zweiten Teil der Arbeit ist die Etablierung eines Modellsystems zur Antigen-spezifischen Suppression dargestellt. Es sollte eine Modell-Zelllinie gefunden werden, welche gegen aktivierte T-Zellen, die von verschiedenen Spendern stammen und unterschiedliche Spezifitäten aufweisen, als Antigen-spezifische Suppressorzelle eingesetzt werden kann. In einem solchen System sollte die Suppressorzelle über pMHC-Moleküle Antigen-spezifisch Toleranz induzieren.

Für die Umsetzung erwies sich die Zelllinie T2 als optimale Lösung: Die T2 Zelllinie ist immortalisiert durch eine Transfektion mit EBV und ein Hybridom aus B- und T-Zelle eines HLA-A2⁺ Spenders. T2 Zellen haben einen Defekt im Transporterprotein TAP und tragen daher ausschließlich unbeladene MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche. Eine exogene Zugabe von Peptiden ins Medium führt sehr effizient zur Bindung der Peptide an die leeren MHC-Komplexe [109]. Beladene T2 Zellen werden insbesondere als Zielzellen für Antigen-spezifische HLA-A2-restringierte zytotoxische T-Zellen eingesetzt [228-230], da sie von diesen gut erkannt und lysiert werden. Dies konnte in eigenen Versuchen funktionell bestätigt werden (Abb. 42). Der neue Aspekt an dem hier dargestellten Modellsystem ist der Einsatz von T2 Zellen nach Antigen-Beladung als Effektorzellen.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil der T2 Zelllinie neben der effizienten exogenen Beladbarkeit mit HLA-A2-bindenden Peptiden ist die unbegrenzte Verfügbarkeit von Effektorzellen. Vor allem im Hinblick auf die begrenzte Ausbeute bei der Aufreinigung von DN T-Zellen (siehe Abschnitt 4.1.2.1) löst ein auf einer immortalisierten Zelllinie basierendes Modellsystem das Problem der sehr aufwändigen Isolation von Spenderzellen aus Frischblut.

Der Einsatz von T2 Zellen als Effektorzellen zeigte, dass die T2 Zellen nicht nur - wie bisher in der Literatur verwendet - als Zielzellen für CTL fungieren können (Abb. 44 A), sondern in einem Apoptose-Test in retrograder Richtung auch Apoptose in spezifischen CTL induzieren können (Abb. 44 B). Dazu wurden Antigen-spezifische CTL als Zielzellen mit PKH26- Farbstoff markiert und anschließend im PKH26-Test (Erklärung des Testprinzips im Abschnitt 4.2.1.2) mit ansteigenden Mengen Antigen-beladener T2 Effektorzellen inkubiert.

Diese Inkubation führte zum Zelltod der Antigen-spezifischen CTL. Diese Effektorzeleigenschaften von T2 Zellen konnten sowohl mit CMV-spezifischen (Abb. 44 B) als auch mit Melan-A-spezifischen CTL (Abb. 47 - 50) verschiedener Spender gezeigt werden.

Die Antigen-spezifität ist in dem Modellsystem mit T2 Zellen ebenfalls verwirklicht: Zunächst wurde die Antigen-spezifität auf der Seite der CTL nachgewiesen: Mittels einer Tetramerfärbung (Färbeschema wie in Abschnitt 4.1.6.1 auf S. 71, Tab. 1) im Anschluss an einen retrograden Apoptose-Test mit T2 Zellen als Effektorzellen konnte gezeigt werden, dass die Apoptose-Induktion ausschließlich in der Antigen-spezifischen Subpopulation der CD8⁺ CTL stattfindet, während die unspezifischen CTL vital bleiben (Abb. 45). Die Herunterregulation des TCR war auch in diesem Test zu beobachten, wie bereits in den autologen Apoptose-Tests mit DN T-Zellen (vgl. Abb. 28 B). Trotzdem ist deutlich zu erkennen, dass der Zuwachs an Annexin⁺ Zellen (Abb. 45, jeweils rechte Quadranten) durch ein Abwandern der zuvor Tetramer-positiven Zellen (Abb. 45, linke obere Quadranten) entsteht, wohingegen aus der Tetramer-negativen Population keine Abwanderung der Zellen zu beobachten ist (Abb. 45, linke untere Quadranten). Dieses Resultat beweist, dass bevorzugt die Melan-A-spezifischen T-Zellen von der Apoptose-Induktion betroffen werden.

Auch auf Seite der Effektorzellen konnte eine Antigen-Spezifität im Modellsystem mit T2 Zellen gezeigt werden: Nur T2 Zellen, welche mit Melan-A Peptid beladen wurden, konnten Apoptose in Melan-A-spezifischen CTL induzieren (Abb. 46). T2 Zellen nach Beladung mit einem irrelevanten Peptid (gp100) sind keine Apoptose-induzierenden Effektorzellen (Abb. 46). Dieser Versuch beweist, dass das hochspezifische Peptid-MHC-Molekül eine Schlüsselfunktion bei der Apoptose-Induktion im Modellsystem mit T2 Zellen einnimmt, und dass es sich dabei nicht um einen unspezifischen Apoptosemechanismus der T2 Zelllinie handelt.

Bei der Beladung der T2 Zellen mit exogenem Peptid kommt es zu keiner Konkurrenz mit endogen prozessierten Peptiden, weshalb eine verhältnismäßig große Menge exogen zugeführten Peptids an die MHC-Moleküle von T2 Zellen binden kann. In einem Titrationsexperiment konnte ermittelt werden, dass das Peptid bis zu einer Konzentration von 3 ng/ml eine effiziente Apoptose-Induktion in CTL bewirkt, die erst bei 0,3 ng/ml abnimmt (Abb. 47). Die Apoptose-Induktion von 70% bei einer Peptidkonzentration von 3 ng/ml sinkt bei einer 10-fachen Verminderung der Peptidkonzentration auf 50% (Abb. 47). Zum Vergleich: Die optimierte Beladungskonzentration für DC zur T-Zell-Stimulation beträgt 30 µg/ml, ist also um den Faktor 10⁵ höher. Dieser Versuch weist auf die effiziente Beladung der T2 Zellen hin und zeigt, dass das pMHC-Molekül ein wichtiges Effektormolekül für die Apoptose-Induktion im T2 Modellsystem ist.

Um die Rolle des pMHC-Moleküls als Schlüsselmolekül für die Apoptose-Induktion im T2 Modellsystem weiter zu charakterisieren, wurde die Apoptose-Induktion durch T2 Zellen mit einem neutralisierenden anti-MHC-I-Antikörper (Klon W6/32) blockiert. Es konnte durch die MHC-I-Blockade von T2 Zellen ein Rückgang der Apoptose von Antigen-spezifischen CTL um 70% bewirkt werden (siehe Abb. 49). Jedoch war der Erfolg

der Blockierung der retrograden Apoptose abhängig von der Peptidkonzentration bei der T2-Beladung: Die Apoptose-Induktion durch 10-fach stärker beladene T2 Zellen (3 ng/ml) konnte mit der gleichen Antikörpermengung nur um ca. 20% reduziert werden (siehe Abb. 49). Dennoch ist hiermit klar gezeigt, dass beladene T2 Zellen Antigen-spezifisch als Effektorzellen fungieren können, und dass das MHC-Molekül eines der Haupteffektormoleküle der Apoptose-Induktion sein muss.

Dass an der Apoptose-Induktion im T2 Modell oberflächenständige Moleküle beteiligt sind, zeigt ein Experiment, in welchem nachgewiesen werden konnte, dass fixierte T2 Zellen ebenso effizient Apoptose in Antigen-spezifischen CTL induzieren können wie vitale, unfixierte Zellen (siehe Abb. 48). Daraus ist zu schließen, dass die Apoptose-Induktion auf der Seite der Effektorzellen keiner enzymatischen Funktionalität bedarf (z.B. Vesikelausschüttung, Rezeptoroligomerisierung), sondern die Apoptose mittels Oberflächenproteinen induziert wird. Damit scheidet eine Perforin/Granzyme vermittelte Zellyse, für welche eine Vesikelausschüttung notwendig ist, als Apoptoseweg aus.

Eine weitere Versuchsserie wurde durchgeführt, um die Rolle von Fas/FasL bei der Apoptose-Induktion im T2 Modellsystem zu klären. Hierfür kam sowohl ein neutralisierender anti-Fas-Antikörper als auch der Caspase 3-Inhibitor DEVD-FMK zum Einsatz (Abb. 50). Die Caspase-3 ist eine "Schlüssel-Caspase" in der Apoptose von Säugetierzellen. In Fas-stimulierten Zellen spaltet die Caspase-3 Gelsolin, wobei die daraus resultierenden Gelsolin-Fragmente zu einem Abbau von Aktinfilamenten und der Einleitung der morphologischen Umwandlung der apoptotischen Zelle führen [231]. Im untersuchten Modellsystem mit T2 Effektorzellen konnte jedoch durch den Einsatz von DEVD-FMK keine Apoptose-Inhibition erreicht werden. Die Zunahme AnnexinV⁺CTL bei zunehmendem T2 : CTL Verhältnis war gegenüber den Kontrollen ohne Inhibitoren gleich hoch (Abb. 50).

Die Tatsache, dass sowohl Perforin/GranzymeB als auch der Fas/FasL Signalweg als mögliche Apoptosewege ausscheiden, lässt zwei Schlussfolgerungen zu: Zum einen sprechen diese Resultate dafür, dass das T2 Modellsystem ein adäquates Modellsystem für die Apoptose-Induktion in DN T-Zellen darstellt. Auch die Apoptose-Induktion in DN T-Zellen konnte als Perforin/GranzymeB und Fas/FasL-unabhängig identifiziert werden. Zum anderen ist dieses Modellsystem auch eine gute Basis, um einen möglicherweise noch kaum charakterisierten Apoptoseweg im humanen System näher zu untersuchen. In der Literatur wird als häufigster Antigen-spezifischer Apoptoseweg der Fas/FasL-Signalweg beschrieben [232-235]. Seltener wird in Knock-out-Modellen eine Unabhängigkeit von FasL für die Antigen-spezifische Apoptose-Induktion beschrieben [221].

Das T2 Modellsystem bietet einen weiteren wesentlichen Vorteil: Zur Untersuchung des Antigen-spezifischen T-Zell-Kontaktes werden oftmals anti-CD3 [170-172] und anti-TCR monoklonale Antikörper [170;172] verwendet, welche die Ligation des TCR nachahmen

sollen. Demgegenüber bietet die Verwendung eines zellulären Systems den deutlichen Vorteil, dass damit keine artifizielle Ligation des TCR stattfindet, sondern dass die TCR über die oberflächenständigen pMHC-Komplexe der T2 Zellen adäquat stimuliert werden. Möglicherweise sind Unterschiede in den Resultaten zu den involvierten Apoptosewegen auch darin begründet.

In Zukunft soll nun im T2 Modellsystem der alternative, Fas-unabhängige Apoptoseweg der Antigen-spezifischen Suppression untersucht werden. Ein Zytokin, welches möglicherweise mit der Apoptose-Induktion in den CTL in engem Zusammenhang steht, ist Interferon- γ (IFN- γ). Die Argumente dafür werden an dieser Stelle kurz ausgeführt:

Erstens ist IFN- γ bekannt für seine scheinbar gegensätzlichen Funktionen im Immungeschehen: Einerseits ist IFN- γ ein proinflammatorisches Zytokin (z.B. wichtigstes Makrophagen-aktivierendes Zytokin), andererseits jedoch ist IFN- γ auch in toleranzinduzierende Phänomene involviert [236-238]. Diese duale Rolle ist auch vom pMHC-Molekül bekannt, welches sowohl an der Aktivierung als auch an der Suppression von T-Zellen maßgeblich beteiligt ist. Es ist denkbar, dass beide Moleküle über das Phänomen der spezifischen Suppression miteinander in Verbindung stehen.

Zweitens konnte gezeigt werden, dass IFN- γ selbst dazu beitragen kann, dass Apoptose in T-Zellen stattfindet. Dabei kommt IFN- γ über Stat-1 eine Rolle bei der Produktion von Caspasen zu [239].

Drittens wird berichtet, dass Tc1 Zellen, welche als Hauptproduzenten von IFN- γ gelten, viel anfälliger für den "Aktivierungs-induzierten Zelltod" durch anti-CD3 und IL-2 Stimulation sind als Th2 und Tc2 Zellen [240].

Und viertens wird bei einer Antigen-spezifischen Stimulation viel IFN- γ sezerniert. Dies wurde auch für die Apoptose-Induktion im autologen System mit DN T-Zellen nachgewiesen (Abb. 32). Es ist also denkbar, dass IFN- γ , welches bei der pMHC-Erkennung sezerniert wird, auch in die retrograde Apoptose-Induktion involviert ist, z.B. dahingehend, dass durch die Freisetzung von IFN- γ in den CTL eine Sensibilität für einen externen oder internen Apoptose-induzierenden Faktor hervorgerufen wird. Da für IFN- γ beschrieben ist, dass es die Expression von pMHC-I-Molekülen hochreguliert [241;242], ist vorstellbar, dass dadurch die retrograde Apoptose-Induktion mittels pMHC-I-Effektormolekülen zusätzlich verstärkt wird.

Das Modellsystem mit T2 Zellen bietet außerdem die Möglichkeit, wichtige Parameter der Antigen-spezifischen Apoptose-Induktion zu untersuchen, welche bereits im murinen System identifiziert wurden und welche sowohl aus immunologischer Sicht, als auch zur Abschätzung von Tumor-escape-Mechanismen von Bedeutung sind. Diese sind die Dauer der Antigen-Stimulation und die Vorstimulation der CTL und deren Korrelation mit der Antigen-spezifischen Apoptose-Induktion:

Iezzi et al. konnten in Versuchen mit anti-CD3 Antikörpern, welche eine TCR-Bindung simulieren, zeigen, dass eine ansteigende Dauer der anti-CD3 Exposition eine

zunehmende Deletion von murinen Effektorzellen induziert [193]. Weitere Hinweise legen nahe, dass die Dauer der TCR-Ligation ein wesentlicher Faktor für die Apoptose-Induktion ist [243].

Ein weiterer, sehr wichtiger Parameter, welcher im Rahmen dieser Arbeit nicht systematisch untersucht werden konnte, ist die Sensitivität der CTL gegenüber Apoptose-Induktion in Abhängigkeit von ihrer Vorstimulation. Kimachi et al. konnten zeigen, dass sich Effektorzellen hinsichtlich ihrer Ligandenaffinität grundlegend von naiven T-Zellen unterscheiden: Während naive T-Zellen auf Liganden mit niedriger Affinität kaum reagieren, proliferieren Effektorzellen sehr gut nach Bindung dieser Liganden [211], wobei es mitunter zum guten Ansprechen gegen Selbstantigene kam. Diese Befunde weisen darauf hin, dass repetitiv stimulierte CD8⁺ T-Zellen möglicherweise die optimalen Zielzellen für die Experimente zur Antigen-spezifischen Suppression sind, da sie auf die TCR-Ligation gut ansprechen. Dieser Effekt wird möglicherweise noch verstärkt durch die Verwendung des sehr immunogenen Melan-A Peptides.

5.2.2 Immunbiologische und klinische Aspekte der pMHC-vermittelten Apoptose von Antigen-spezifischen T-Zellen

In einem Großteil der Versuche zur retrograden Apoptose-Induktion (mit Ausnahme der CMV-spezifischen Zellen in Abb. 44) wurde sowohl für die Expansion der CTL als auch für die Beladung der T2 Zellen modifiziertes Peptid [Melan-A₂₆₋₃₅ ELAGIGILTV] verwendet, welches einen Austausch einer Aminosäure an Position 2 gegenüber der Wildtyp-Sequenz aufweist [EAAGIGILTV] und damit eine deutlich höhere Immunogenität besitzt [244]. Nur dadurch war es möglich, von vielen Spendern gut expandierende CTL-Linien mit einer hohen Frequenz spezifischer T-Zellen zu generieren. Von Meidenbauer et al. konnte gezeigt werden, dass die mit dem modifizierten Melan-A expandierten CTL in der Lage sind, Wildtyp-Peptid bzw. endogen prozessiertes Peptid zu erkennen [192]. Um nun ein Artefakt des modifizierten Peptids auszuschließen und die *in vivo*-Relevanz der pMHC-vermittelten Apoptose-Induktion weiter zu unterstreichen, wurden Experimente mit Melan-A-exprimierenden Tumorzellen durchgeführt. Hierfür wurden drei verschiedene Tumorzelllinien verwendet, von denen nur zwei Melan-A exprimieren (Abb. 51). Für die Melan-A-exprimierenden Tumorzelllinien konnte eine Apoptose-Induktion in Melan-A-spezifischen CTL detektiert werden. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass auch endogen prozessiertes Melan-A eine Apoptose-Induktion bewirken kann. Die Melan-A negative Tumorzelllinie Na8 konnte dagegen keine Apoptose von Melan-A spezifischen CTL induzieren (Abb. 52). Werden jedoch die HLA-A2-Moleküle der Na8 Tumorzellen durch exogen zugeführtes Melan-A beladen, so können auch diese Tumorzellen Apoptose in CTL induzieren (Abb. 52, A und B Na8). Auch die durch endogen prozessiertes Melan-A induzierte retrograde Apoptose kann durch einen neutralisierenden anti-MHC-I-Antikörper blockiert werden (Abb. 52 B). Diese

Befunde lassen vermuten, dass die pMHC-vermittelte Apoptose-Induktion ein Mechanismus des tumoralen Immun-Escapes sein könnte. Im Jahr 2002 wurde ein Artikel von Menon et al. veröffentlicht, in welchem 88 Patienten mit kolorektalen Karzinomen hinsichtlich ihrer Prognose und des krankheitsfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Stärke der HLA-A und HLA-B/C Expression auf den Tumorzellen untersucht wurden. Die Autoren stellten fest, dass Patienten mit Tumoren, deren MHC-I-Expression herunterreguliert war, eine niedrigere Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv hatten und ein längeres krankheitsfreies Überleben aufwiesen [245]. Patienten mit Tumoren, die einen totalen Verlust der MHC-I Expression ($n = 10$) aufwiesen, erlitten kein Rezidiv und hatten somit die beste Prognose. Dieser Befund ist überraschend, da zuvor die Herunterregulation des MHC-I als Immun-Escape-Strategie des Tumors bekannt war, um dem Angriff von zytotoxischen T-Lymphozyten zu entgehen. Dies ist in der Tat bei anderen neoplastischen Erkrankungen, wie z.B. für Melanome [246] und Brustkrebs [247], gezeigt. Beim kolorektalen Karzinom zeigt sich jedoch, dass die Herunterregulation von HLA-A und HLA-B/C ein günstiger prognostischer Marker ist. Dieser Befund würde sich mit den hier gezeigten Ergebnissen decken, dass Melan-A-exprimierende Tumoren Apoptose in CTL induzieren können. Der MHC-I-Komplex ist für die Tumorzelle demnach nicht nur ein Angriffspunkt für T-Zellen, sondern eventuell auch *in vivo* ein wichtiges Effektormolekül. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Tumorzellen mit herunterregulierter MHC-I Expression zusätzliche zelluläre Alterierungen aufweisen, die eine physiologische Benachteiligung des Tumors und aus diesem Grund ein besseres Überleben des Patienten zur Folge haben.

In der Literatur sind verschiedene Ansätze zur Deletion spezifisch stimulierter T-Zellen mittels löslicher pMHC-Komplexe beschrieben. So berichten O'Harrin et al., dass durch die *in vivo* Verabreichung von dimeren pMHC-Molekülen in Mäusen eine Blockade Antigen-spezifischer T-Zellen induziert wird, so dass es zum Verlust der Kontrolle über allogene Tumoren kommt [248]. Außerdem wurde in einem anderen Mausmodell gezeigt, dass eine mehrmalige Verabreichung löslicher MHC-I-Tetramere in Transplantationsmodellen zu verlangsamten Abstoßungsreaktionen führt, weswegen eine Anergie und Apoptose von Transplantat-reaktiven T-Zellen vermutet wird [249]. Auch in den Versuchen von Geissler et al. induzieren lösliche MHC-Komplexe, die von Hepatocyten freigesetzt werden im Mausmodell eine Transplantat-Toleranz [93].

Die Apoptose-induzierende Funktion löslicher MHC-Komplexe konnte in der vorliegenden Arbeit für repetitiv-stimulierte Antigen-spezifische humane Effektor/Gedächtnis-Zellen bestätigt werden: So konnte gezeigt werden, dass Melan-A-MHC-Tetramere in Melan-A-spezifischen CTL Apoptose induzieren können (Abb. 53): Die Zahl PI^+ (toter) Zellen nach 13 h Inkubation ist bei Zugabe der adäquaten Melan-A-MHC-Tetramere ($> 30\%PI^+$) im Vergleich zu den irrelevanten MHC-Tetrameren ($< 5\%PI^+$) deutlich erhöht. Dieses Resultat spiegelt exakt die Hinweise der Literatur wieder, die

darauf hinweisen, dass für die Apoptose-Induktion in aktivierten T-Zellen auf den Zielzellen nicht unbedingt Todesrezeptoren notwendig sind. Es gibt einige Hinweise dafür, dass die involvierten Todesrezeptoren von den aktivierten T-Zellen selbst [186] oder von den Nachbarzellen stammen können. Zum Beispiel wurde von Contini et al. beschrieben, dass durch Zugabe löslicher MHC-Moleküle, die aus Serum gesunder Spender aufgereinigt wurden, Apoptose in EBV-spezifischen CTL induziert werden kann. Bei der Bindung der löslichen MHC-Komplexe an die spezifischen CTL induzieren sie die Freisetzung von löslichem FasL durch die spezifischen T-Zellen. In diesem Fall stammt also der Todesrezeptor direkt von den aktivierten T-Zellen selbst. Bei diesem Vorgang scheint das CD8-Molekül eine wichtige Funktion einzunehmen [250].

Außerdem können auch Todesrezeptoren auf benachbarten aktivierten T-Zellen die Apoptose-Induktion in aktivierten T-Zellen induzieren. In diesem Fall erkennt die aktivierte T-Zelle das adäquate Antigen auf der Zielzelle. Dadurch wird sie sensibel für die Fas/ FasL vermittelte Apoptoseinduktion durch "Bruderzellen" [156].

Es muss betont werden, dass der Signalfluss über den pMHC-I-Komplex von wesentlicher Bedeutung für die Eindämmung des klonalen Wachstums von T-Zellen ist. Von Li et al. wurde im Jahr 1999 die Bedeutung des pMHC-Komplexes für die Ausbildung von Toleranz nach Transplantationen beschrieben [251]. Für die Ausbildung echter Toleranz gegenüber allogenen Transplantaten scheint eine Apoptose alloreaktiver T-Zellen essentiell zu sein. Hierzu setzte die Arbeitsgruppe Inhibitoren gegen die kostimulatorischen Moleküle (Signal 2) ein und kombinierte diese mit verschiedenen Immunsuppressiva. Dabei fand sie, dass immunsuppressive Wirkstoffe, welche den Signalfluss über den pMHC (Signal 1) blockieren, wie z.B. Cyclosporin A (CsA, ein Calcineurin-Inhibitor), zwar die Symptome einer Abstoßung unterdrücken, jedoch ungeeignet zur Ausbildung echter Transplantattoleranz sind. Immunsuppressiva, welche nach dem Prinzip von CsA wirken, stoppen zwar die T-Zell-Aktivierung und Apoptose, erlauben damit jedoch nicht die wichtige Entfernung der allo-reaktiven CTL, weshalb es beim Absetzen der Immunsuppressiva leicht zur Abstoßung kommen kann. Immunsuppressiva wie Rapamycin hingegen, welche in Proliferations-Signalwege der T-Zelle eingreifen, jedoch nicht die Signaltransduktion über den pMHC-I Komplex inhibieren, können zur Ausbildung echter Toleranz führen [251]. Diese Befunde zeigen, dass die Signaltransduktion über den pMHC-Komplex für die Deletion allospezifischer CTL und damit für die Ausbildung echter Toleranz wesentlich ist. Dass T-Zell-Apoptose scheinbar ein Hauptprinzip peripherer Toleranzinduktion ist, konstatiert dieselbe Arbeitsgruppe in einem weiteren Artikel [252], in welchem die Mechanismen, die zur Ausbildung "echter Toleranz" führen, näher beleuchtet werden. Neben den genannten Situationen einer gewünschten T-Zell-Apoptose gibt es außerdem Erkrankungen, bei welchen eine T-Zell-Apoptose verhindert werden soll. Bei Tumorerkrankungen

beispielsweise müssen diejenigen Suppressormechanismen, welche eine effiziente anti-Tumor-Immunantwort unterdrücken, unterbrochen werden.

Eine weitere spannende klinische Implikation besteht in der Therapie von T-Zell-Lymphomen, bei welchen es sich um ein klonales Wachstum von T-Zellen handelt. Eine therapeutische Verabreichung löslicher pMHC-Moleküle zur Eindämmung des klonalen Wachstums ist ein zellfreier Therapieansatz, welcher im Mausmodell bereits erfolgreich getestet wurde [168].

5.2.3 Die protektive Rolle der kostimulatorischen Moleküle - ein neues, hypothetisches Modell der Antigen-spezifischen Suppression

Die kostimulatorischen Moleküle sind als "Signal 2" neben dem über den pMHC/TCR Komplex vermittelten ersten Signal Schlüsselmoleküle für die Induktion und Expansion von T-Zellen [253]. Eine Transfektion von Tumorzellen mit kostimulatorischen Molekülen wie CD80 bewirkt in *in vitro* Versuchen eine verstärkte Induktion und Expansion von Tumor-reaktiven T-Zellen [254;255]. Für die *in vitro* Expansion von T-Zellen werden auch sog. "artifizielle APC", d.h. Eisenkügelchen (Beads), welche mit Peptid-HLA-Ig-Dimeren und anti-CD28 Antikörper beschichtet sind, eingesetzt. Artifizielle APC fungieren als Stimulatoren für CTL und führen zur Expansion der CTL [256]. Als wichtiger Faktor für die stimulatorische Kapazität artifizieller APC wird die Präsenz der kostimulatorischen Moleküle angesehen.

Es gibt zahlreiche Hinweise in der Literatur, dass das kostimulatorische Signal nicht nur für die Induktion naiver T-Zellen wichtig ist, sondern auch für reife, periphere T-Zellen eine wichtige Bedeutung hat. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Ligation alleine über den TCR in T-Zellen Apoptose induziert, während eine Koligation mit kostimulatorischen Molekülen diese Apoptose verhindern kann [186;257;258].

Zur Simulation des kostimulatorischen Signals werden oftmals anti-CD28 Antikörper eingesetzt [193;257]. So konnten Iezzi et al. zeigen, dass die Antigen-induzierte Proliferationsinhibition in murinen, reifen T-Zellen durch die Zugabe von anti-CD28 Antikörper vermindert wird [193]. Die molekulare Ursache für diesen Befund konnte inzwischen von einigen Gruppen aufgedeckt werden: Die Ligation von CD28 auf CTL führt zur Hochregulation von Bcl-X_L, einem Apoptose-protectiven Molekül, welches förderlich für das Überleben der T-Zellen ist [188;259]. Es scheint innerhalb des CD28-Moleküls zwei distinkte Motive zu geben, von denen eines für die Proliferation zuständig ist und das andere die Induktion von bcl-X_L, also das Überleben, vermittelt [260].

Abschließend wird ein Modell zur Erklärung der Apoptose-Induktion in Antigen-spezifischen CTL vorgeschlagen, welches mit Hilfe des T2-Modellsystems in Zukunft untersucht werden soll: Es wird postuliert, dass das Verhältnis zwischen spezifischem Stimulus und Kostimulus über Apoptose und Überleben von reifen Effektor/Memory T-Lymphozyten entscheidet.

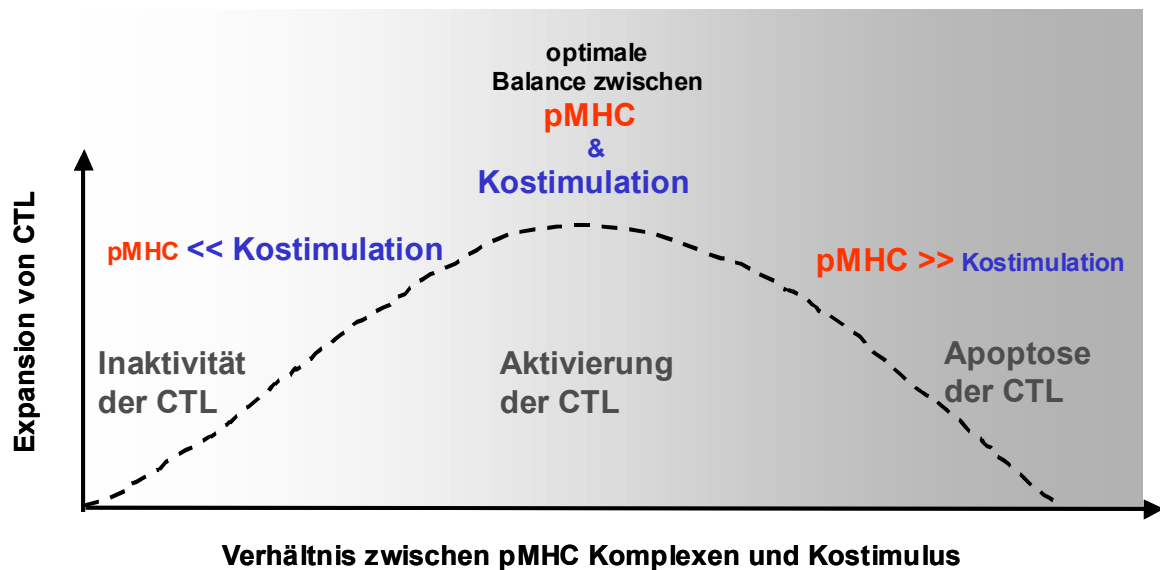


Abb. 54: Hypothetisches Modell zum Verhältnis zwischen pMHC (Signal 1) und Kostimulation (Signal 2) und deren Effekt auf die Expansion und das Überleben von Antigen-spezifischen CTL. Für jede mögliche "Stimulatorzelle" von T-Zellen gibt es eine optimale Balance zwischen pMHC und kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche. Diese ist ausschlaggebend für ihre stimulatorische Wirkung auf T-Zellen. In der ansteigenden Flanke der Kurve kann der Kostimulus durch eine höhere Präsenz von adäquaten pMHC-Komplexen ausgeschöpft werden. In der abfallenden rechten Flanke überwiegt das pMHC-Signal, überflügelt die Kostimulation und führt zur Apoptose von CTL.

Antigen-beladene T2 Zellen, so konnte gezeigt werden, können im Modellsystem sehr effizient Apoptose induzieren (siehe z.B. Abb. 46). Diese Apoptose-Induktion findet trotz der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf den T2 Zellen statt (Tab. 2). Ein möglicher Grund dafür ist die starke Überzahl Antigen-beladener MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche. Dadurch kann es zu einem Missverhältnis zwischen pMHC-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen kommen. Damit wird die Balance zwischen pMHC-Signal und kostimulatorischem Signal als ein wesentlicher Parameter der T-Zell-Apoptose in Effektor/Memory T-Zellen.

Die Entscheidung über Proliferation oder Apoptose einer T-Zelle wird demnach für jede beliebige Stimulator- bzw. Suppressorzelle durch das Verhältnis von Kostimulation zu pMHC-Besatz auf einer Zelle definiert (siehe Modell, Abb. 54): Ohne pMHC-Moleküle kann keine Aktivierung stattfinden. In der ansteigenden Flanke der Kurve kann die stimulatorische Kapazität des Kostimulus durch eine höhere Präsenz von adäquaten pMHC-Komplexen ausgeschöpft werden. In der abfallenden, rechten Flanke der Kurve überwiegt das pMHC-Signal gegenüber dem Signal der Kostimulation. In diesem Fall kommt es zur Apoptose von CTL. Um diese Hypothese zu bestätigen, sollen in Zukunft artifizielle APC zum Einsatz kommen, die eine unterschiedliche Dichte von kostimulatorischen bzw. pMHC-Molekülen tragen.

In dem hier dargestellten Modell ist die intrazelluläre Verrechnung von pMHC und kostimulatorischen Signalen ein wesentlicher Bestandteil. Rachmilewitz und Lanzavecchia haben kürzlich ein wichtiges Modell zur Aufsummierung einzelner TCR-

Signale vorgestellt [261]. Dieses Modell, welches auf einer seriellen Ligierung des TCR beruht, ist der Signalverarbeitung in Neuronen entlehnt: Sukzessive intrazelluläre second-messenger-Signale, welche durch die Ligation einzelner TCR zustandekommen, bauen sich schnell wieder ab, können jedoch durch die serielle Ligation von TCR aufsummiert werden. Je größer die Affinität der Agonisten ist, desto schneller wird ein Schwellenwert erreicht, an dem eine biologische Antwort der T-Zelle einsetzt. In diesem Modell wird die Kostimulation als "Verstärker" beschrieben, welcher dafür sorgt, dass der Schwellenwert schneller erreicht werden kann. Im Rahmen des hier aufgestellten Modells wird nun postuliert, dass es bei der Antigen-spezifischen Suppression möglicherweise auch zu einer Aufsummierung und Integrierung von pMHC-Signalen und gegenläufigen kostimulatorischen Signalen kommt. Die Summe des Integrals determiniert letztendlich das Schicksal der T-Zelle.

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die wissenschaftlichen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Suppressorfunktion humaner DN T-Zellen analysiert. In allogenen Versuchsansätzen konnte erstmals eine "Veto-Funktion" unstimulierter *ex vivo* aufgereinigter TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zellen gegenüber CTL nachgewiesen werden. Wesentlich für die Suppression ist dabei der Verwandtschaftsgrad zwischen Stimulatorzellen und Suppressorzellen. Das MHC-Molekül kann somit als die Grundlage der "Veto-Funktion" bestätigt werden. Das bedeutet, dass der MHC-Komplex auf der Suppressorzelle in Interaktion mit alloreaktiven Responderzellen tritt. Erstmals konnte auch gezeigt werden, dass die Veto-Aktivität von Nicht-Suppressorzellen durch eine Vorkultur mit reifen dendritischen Zellen vom Stimulator-Typ erworben werden kann.

In einem autologen Versuchsaufbau konnte erstmals gezeigt werden, dass beide Subpopulationen von DN T-Zellen (TCR $\alpha\beta^+$ und TCR $\gamma\delta^+$) nach einer Konditionierungskultur mit Peptid-beladenen DC in der Lage sind, Apoptose von Antigen-spezifischen CTL zu induzieren. Eine Vorkultur mit dendritischen Zellen ist eine notwendige Voraussetzung für diesen Effekt. Eine Haupterklärung dieses Phänomens kann der Transfer von pMHC-Molekülen sein: Die Übertragung von pMHC-Molekülen von DC auf DN T-Zellen konnte als langsamer, TCR-unabhängiger, Zell-Zell-Kontakt-abhängiger Prozess charakterisiert werden.

Der Transfer von pMHC-Molekülen führt zu einer Präsentation der pMHC-Moleküle auf der Oberfläche der DN T-Zellen, wobei die Moleküle funktionell aktiv sind. Die Antigen-spezifische Suppression mittels pMHC-Komplexen als Effektormolekülen auf DN T-Zellen zeigt, dass das Veto-Konzept, welches in der Literatur für das allogene System formuliert wurde, ausgedehnt werden kann auf Antigen-spezifische T-Zell-Antworten.

TCR $\alpha\beta^+$ und TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zellen weisen große funktionelle Ähnlichkeit auf sowohl beim Transfer der pMHC-Komplexe, bei der Suppression Antigen-spezifischer T-Zellen, als auch in dem Zytokinmuster (v.a. IFN- γ), das während der Suppression sezerniert wird. Diese Resultate deuten darauf hin, dass der TCR für die Suppressorfunktion von DN T-Zellen keine wesentliche Rolle spielt. In Blockadeversuchen mit TCR $\gamma\delta^+$ DN T-Zellen deutet sich an, dass sowohl der Peforin/Granzyme- als auch der Fas/FasL als Apoptoseweg ausgeschlossen werden können.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Modellsystem zur retrograden Apoptose-Induktion mit pMHC-Komplexen als Effektorstrukturen aufgebaut. Hierfür wurde die exogen beladbare T2 Zelllinie als Effektorzelllinie zur Apoptose-Induktion von Antigen-spezifischen CTL eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der spezifischen Antigenerkennung mit T2 Zellen zu einer bidirektionalen Apoptose-Induktion kommt. Eigene Experimente zeigen, dass Melan-A-exprimierende Tumorzelllinien Apoptose in

Melan-A-spezifischen CTL induzieren. Zahlreiche Hinweise aus der Literatur mit löslichen pMHC-Komplexen, und agonistischen anti-CD3 - bzw. anti-TCR Antikörpern weisen ebenfalls darauf hin, dass die reife T-Zelle über den TCR ein apoptotisches Signal erhalten kann. Diese Ergebnisse sind für therapeutische Ansätze zur Modulation des spezifischen Immunsystems (Tumor-, Transplantations- und Autoimmunologie) von großem Interesse.

In zukünftigen Experimenten wird das T2 Modellsystem zur Aufklärung des Mechanismus der Perforin/Granzyme- und Fas/FasL-unabhängigen Antigen-spezifischen Suppression eingesetzt werden. Dabei soll auch eine mögliche Rolle von IFN- γ untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit stellt ein hypothetisches Modell für die Antigen-spezifische Apoptose-Induktion vor, welches der dualen Rolle von pMHC-Komplexen als Aktivierungs- und als Suppressormoleküle gerecht wird. Die kostimulatorischen Moleküle haben darin eine Apoptose-protective Funktion gegenüber CTL. Weiter wird postuliert, dass die Balance zwischen pMHC und kostimulatorischen Molekülen über Apoptose oder Überleben/Expansion von CTL entscheidet, und dass möglicherweise eine interne Integrierung von second-messenger Signalen aus pro- und anti-apoptotischen Signalfüssen in der aktivierten T-Zelle stattfindet.

6 Anhang

6.1 Berechnungsmethoden

6.1.1 Berechnung vitaler Zellen in den autologen Apoptose-Tests

Kontrollansatz (ohne Suppressorzellen):

K: Anzahl CD8⁺ in der Kontrolle (aus Dotplot ablesen)

K(TM) Anzahl TM⁺ Zellen in der Kontrolle (aus Dotplot ablesen)

$$K(TM\text{Anteil}) = \frac{100}{K} \times K(TM) \text{ Anteil TM}^+ \text{ Zellen an gesamt CD8}^+ \text{ in der Kontrolle}$$

Suppressor : Zielzell Verhältnis x (ratio x) :

A: Anzahl CD8⁺ bei ratio x (ablesen)

A(TM⁺Ann⁻): Anzahl TM⁺Ann⁻ Zellen in gesamt CD8⁺ bei ratio x (ablesen)

$$A(TM\text{ soll}): \frac{A}{100} \times K(TM\text{Anteil}) \text{ Anteil TM}^+ \text{ Zellen an gesamt CD8}^+ \text{ bei ratio x}$$

Prozentualer Anteil von TM⁺Ann⁻ Zellen innerhalb der gesamten TM⁺ Zellen bei ratio x:

$$\frac{100}{A(TM\text{soll})} \times A(TM + Ann-)$$

Um den apoptotischen Effekt von DN T-Zellen zu kalkulieren, wurden nicht die apoptotischen Zellen innerhalb der spezifischen (TM⁺) Zellen ermittelt, sondern der Verlust an vitalen, spezifischen Zellen. Der Grund dafür ist, dass die vitalen Zellen leicht aus dem Plot abgelesen werden können, wohingegen eine Ermittlung der apoptotischen TM⁺ Zellen aufgrund des Verlustes des TCR während des Apoptose-Tests nicht mehr möglich ist.

Hierfür wird zunächst im Kontrollansatz (ohne Suppressorzellen) der Anteil an TM⁺ Zellen innerhalb aller gegateten CD8⁺ Zellen ermittelt [K(TMAnteil)]. Dieser Anteil wird nun für Ratio x als Berechnungsgrundlage genommen, um theoretisch zu ermitteln, wieviele TM⁺ Zellen sich innerhalb der CD8⁺ Zell-Population befinden sollten [A(TM soll)]. Zuletzt wird aus dem Dotplot die Absolutzellzahl vitaler, spezifischer Zellen [A(TM⁺Ann⁻)] abgelesen und ermittelt, wieviele TM⁺ Zellen in einem vitalen Zustand vorliegen:

$$\frac{100}{A(TM\text{soll})} \times A(TM + Ann-)$$

Die Berechnung stützt sich auf die Annahme, dass nach einer Inkubationsdauer von 4 h die Zellen zwar apoptotisch werden, jedoch nicht aus dem Aufnahme Fenster verschwinden. Dies wäre der Fall, wenn angegriffene Zellen in den Bereich subzellulärer Partikel wandern. Bei einer Inkubationszeit von 4 h ist davon jedoch nicht auszugehen.

6.1.2 Auswertung PKH26-Test

In die Auswertung werden nur PKH26⁺ Zielzellen eingeschlossen. Für die Ermittlung der AnnexinV (Ann)⁺ Zielzellen bei einem definierten Effektor : Target Verhältnis wird die Hintergrund-Apoptose subtrahiert **(I)**. Da jedoch aufgrund der Subtraktion der Hintergrundapoptose prinzipiell nie 100% tote Zellen erreicht werden können (auch in dem Fall, dass alle Zellen lysiert wurden), wird der Prozentsatz erreichbarer Zellen ermittelt **(II)**. Die relative Anzahl Ann⁺ Zielzellen wird dann ins Verhältnis gesetzt zum erreichbaren Prozentsatz Ann⁺ Zielzellen **(III)**. Dieser Wert wurde jeweils als %Ann⁺ Zellen in den jeweiligen Diagrammen angegeben.

Ann (x absolut): %Ann⁺ Zellen innerhalb der PKH26⁺ Zielzellen beim Effektor : Target Verhältnis x (abgelesen aus Dotplot)

Ann (0): %Ann⁺ Zellen innerhalb der PKH26⁺ Zielzellen in der Kontrolle (o. Effektorzellen)
(abgelesen aus Dotplot)

(I) Ann (x relativ): Ann (x) - Ann (0)

(II) %Ann (x erreichbar): 100% - Ann (0)

(III) % Ann⁺ (ratio x errechnet) = $100 / \text{Ann (x erreichbar)} * \text{Ann (x relativ)}$

6.2 Danksagung

Mein erster Dank gebührt vor allem meinem Betreuer Prof. Dr. Andreas Mackensen, der mir von Anfang an große forschende Freiheit zugestand und mir starkes Vertrauen entgegenbrachte. Durch seine Aufgeschlossenheit lernte ich viel über den Gewinn aus dem thematischen und menschlichen Austausch zwischen Wissenschaftlern. Er förderte mich auf allen Ebenen und ermöglichte mir die Teilnahme an internationalen Kongressen. Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Susanne Modrow für die Übernahme der Betreuung der Dissertation seitens der biologischen Fakultät.

Danke sagen möchte ich außerdem an vorderster Stelle meinem lieben Ehemann Markus sowie meiner ganzen Familie, welche mir in der entbehrungsreichen Zeit intensiver Laborarbeit treue Wegbegleiter waren. Ihnen verdanke ich das Meiste.

Ferner danke ich Prof. Dr. med. Reinhard Andreesen, dem Leiter der hämatologischen Abteilung, für die Förderung meiner wissenschaftlichen Pläne und die Überarbeitung meiner Manuskripte und Anträge. Von seiner Bestrebung, ein Klima des engagierten Austausches zwischen Forschung und Klinik in der Abteilung zu schaffen, habe ich sehr profitiert.

Jana Heymann möchte ich besonders danken für ihre motivierte technische Assistenz und ihr Interesse für die thematischen Zusammenhänge. Außerdem danke ich ihr herzlich für die engagierte Betreuung der DN T-Zell-Klone.

Ein besonderer Dank ergeht an Prof. Dr. Li Zhang in Toronto. Ihr revolutionäres Modell Antigen-spezifischer Suppression war ein Anstoß für mutige Konzepte in meiner Arbeit. Der wissenschaftliche Austausch mit ihr und Dr. Kevin Young war zu jeder Zeit anregend.

Dr. Matthias Edinger, Dr. Petra Hoffmann, Dr. Meidenbauer, PD Dr. Kreutz, PD Dr. Krause, Dr. Krishna Mondal und PD Dr. Fleck danke ich für konstruktiven Ideenaustausch.

Mein herzlicher Dank ergeht an die wissenschaftlichen und klinischen Kooperationspartner: PD Dr. Leoni Kunz-Schughart und Marit Hoffmann (Pathologie der Uniklinik Regensburg) bin ich zu großem Dank verpflichtet für die gute Zusammenarbeit in der fluoreszenten Zellsortierung. PD Dr. Martin Fleck danke ich für die Probenakquirierung in der rheumatologischen Ambulanz der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin-I des Universitätsklinikums Regensburg.

Danke sagen möchte ich auch jenen Kooperationspartnern, mit denen wir zusammen das Monitoring von DN T-Zellen bei Leukämiepatienten nach allogener Transplantation durchgeführt haben, ein Nebenprojekt, das in dieser Arbeit nicht ausgeführt wurde: Hier gebührt mein Dank dem gesamten Stations- und Ambulanzteam der KMT-Transplantationseinheit, insbesondere Prof. Dr. E. Holler, Dr. Hahn, Dr. Gerbitz, Dr. Wittnebel, Dr. Pötscher, Dr. Erdmann, Dr. Grube, Dr. Kolbinger, Schwester Angelika, dem

Team der Blutabnahmestelle und den beiden technischen Assistentinnen des Stammzelllabors.

Sandra Vogl, Monika Laumer und Jana Heymann danke ich für das ausgesprochen freundschaftliche Arbeitsverhältnis in einfachen und schwierigen Zeiten des Laboralltags. Ferner danke ich der weiteren Laborbesetzung der José-Carreras-Forschungseinheit: Gerry Thonigs, Matthias Gehrmann, Catharina Groß, Lydia Rossbacher, Robert Gastpar, Andreas Wortmann, Christian Greiml, Marion Brunner, Simone Helke, Stefan Stangl, Katharina Hüttmann, Clemens Baier und Christian Eichelberg für die besonders nette Zusammenarbeit.

Conny Winter hat mich in ihrer Einarbeitungszeit ferner unterstützt beim routinemäßigen Aufarbeiten der Blutproben, wofür ich ihr danken möchte. Dr. Matthias Oelke (Baltimore, USA) danke ich für das zur Verfügung gestellte CMV-Peptid.

Ein schließendlicher Dank sei all jenen Patienten ausgesprochen, die trotz teilweise stark beeinträchtigender Erkrankungen eingewilligt haben in Blutentnahmen. Ohne ihre Kooperationsbereitschaft wäre die Untersuchung der *in vivo* Relevanz von DN T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen nicht möglich gewesen.

6.3 Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den _____
(Karin Fischer, Dipl. Biol.)

6.4 Literaturverzeichnis

- (1) Andersen ML, Ruhwald M, Nissen MH, Buus S, Claesson MH. Self-Peptides with Intermediate Capacity to Bind and Stabilize MHC Class I Molecules may be Immunogenic. *Scand J Immunol* 2003; 57(1):21-27.
- (2) Fillion MC, Proulx C, Bradley AJ, Devine DV, Sekaly RP, Decary F, Chartrand P. Presence in peripheral blood of healthy individuals of autoreactive T cells to a membrane antigen present on bone marrow-derived cells. *Blood* 1996; 88(6):2144-2150.
- (3) Zippelius A, Pittet MJ, Batard P, Rufer N, De Smedt M, Guillaume P, Ellefsen K, Valmori D, Lienard D, Plum J, MacDonald HR, Speiser DE, Cerottini JC, Romero P. Thymic selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans. *J Exp Med* 2002; 195(4):485-494.
- (4) Saruhan-Direskeneli G, Celet B, Eksioglu-Demiralp E, Direskeneli H. Human HSP 60 peptide responsive T cell lines are similarly present in both Behcet's disease patients and healthy controls. *Immunol Lett* 2001; 79(3):203-208.
- (5) Hellings N, Baree M, Verhoeven C, D'hooghe MB, Medaer R, Bernard CC, Raus J, Stinissen P. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurosci Res* 2001; 63(3):290-302.
- (6) Andreassen K, Bendiksen S, Kjeldsen E, Van Ghelue M, Moens U, Arnesen E, Rekvig OP. T cell autoimmunity to histones and nucleosomes is a latent property of the normal immune system. *Arthritis Rheum* 2002; 46(5):1270-1281.
- (7) Martin R, Jaraquemada D, Flerlage M, Richert J, Whitaker J, Long EO, McFarlin DE, McFarland HF. Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Immunol* 1990; 145(2):540-548.
- (8) Pelfrey CM, Tranquill LR, Vogt AB, McFarland HF. T cell response to two immunodominant proteolipid protein (PLP) peptides in multiple sclerosis patients and healthy controls. *Mult Scler* 1996; 1(5):270-278.
- (9) Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Chen W, Nakao S, Hess AD. Cytokine and chemokine profiles in autologous graft-versus-host disease (GVHD): interleukin 10 and interferon gamma may be critical mediators for the development of autologous GVHD. *Blood* 2002; 100(7):2650-2658.

- (10) Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Sommer M, Lefell S, Ueda M, Nakao S, Hess AD. Characterization of the T-cell repertoire in autologous graft-versus-host disease (GVHD): evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in the development of autologous GVHD. *Blood* 2001; 98(3):868-876.
- (11) Sica S, Chiusolo P, Salutari P, Piccirillo N, Laurenti L, Sora F, La Barbera EO, Serafini R, Massi G, Serra FG, Leone G. Autologous graft-versus-host disease after CD34+-purified autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9(3):375-379.
- (12) van der Wall E, Horn T, Bright E, Passos-Coelho JL, Bond S, Clarke B, Altomonte V, McIntyre K, Vogelsang G, Noga SJ, Davis JM, Thomassen J, Ohly KV, Lee SM, Fetting J, Armstrong DK, Davidson NE, Hess AD, Kennedy MJ. Autologous graft-versus-host disease induction in advanced breast cancer: role of peripheral blood progenitor cells. *Br J Cancer* 2000; 83(11):1405-1411.
- (13) Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970; 18(5):723-737.
- (14) Kilshaw PJ, Brent L, Pinto M. Suppressor T cells in mice made unresponsive to skin allografts. *Nature* 1975; 255(5508):489-491.
- (15) Groux H, Sornasse T, Cottrez F, De Vries JE, Coffman RL, Roncarolo MG, Yssel H. Induction of human T helper cell type 1 differentiation results in loss of IFN-gamma receptor beta-chain expression. *J Immunol* 1997; 158(12):5627-5631.
- (16) Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 2001; 103(2):131-136.
- (17) Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000; 164(1):183-190.
- (18) Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; 101(5):455-458.
- (19) Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; 193(11):1285-1294.
- (20) Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193(11):1303-1310.

- (21) Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, Isaacs JD, Lechler RI. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001; 98(9):2736-2744.
- (22) Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194(5):629-644.
- (23) Mason D, Powrie F. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(6):649-655.
- (24) Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001; 182:58-67.
- (25) Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195(6):695-704.
- (26) Gran B, Rostami A. T cells, cytokines, and autoantigens in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2001; 1(3):263-270.
- (27) Saez-Torres I, Brieva L, Espejo C, Barrau MA, Montalban X, Martinez-Caceres EM. Specific proliferation towards myelin antigens in patients with multiple sclerosis during a relapse. *Autoimmunity* 2002; 35(1):45-50.
- (28) Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 2000; 6(7):782-789.
- (29) Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 2001; 15(5):751-761.
- (30) Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999; 285(5425):221-227.
- (31) Penninger JM, Crabtree GR. The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell* 1999; 96(1):9-12.
- (32) Dustin ML, Olszowy MW, Holdorf AD, Li J, Bromley S, Desai N, Widder P, Rosenberger F, van der Merwe PA, Allen PM, Shaw AS. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 1998; 94(5):667-677.

- (33) Cai Z, Kishimoto H, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Sprent J. Requirements for peptide-induced T cell receptor downregulation on naive CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 1997; 185(4):641-651.
- (34) Preckel T, Grimm R, Martin S, Weltzien HU. Altered hapten ligands antagonize trinitrophenyl-specific cytotoxic T cells and block internalization of hapten-specific receptors. *J Exp Med* 1997; 185(10):1803-1813.
- (35) Huang JF, Yang Y, Sepulveda H, Shi W, Hwang I, Peterson PA, Jackson MR, Sprent J, Cai Z. TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science* 1999; 286(5441):952-954.
- (36) Tsang JY, Chai JG, Lechler R. Antigen presentation by mouse CD4⁺ T cells involving acquired MHC class II:peptide complexes: another mechanism to limit clonal expansion? *Blood* 2003; 101(7):2704-2710.
- (37) Hudrisier D, Riond J, Mazarguil H, Gairin JE, Joly E. Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *J Immunol* 2001; 166(6):3645-3649.
- (38) Delon J, Bercovici N, Raposo G, Liblau R, Trautmann A. Antigen-dependent and -independent Ca²⁺ responses triggered in T cells by dendritic cells compared with B cells. *J Exp Med* 1998; 188(8):1473-1484.
- (39) Gunzer M, Schafer A, Borgmann S, Grabbe S, Zanker KS, Brocker EB, Kampgen E, Friedl P. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* 2000; 13(3):323-332.
- (40) Revy P, Sospedra M, Barbour B, Trautmann A. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2001; 2(10):925-931.
- (41) Young KJ, Fischer K, Lyndsey K, Du Temple B, Philips J, Mackensen A, Zhang L. Bidirectional function of DN T regulatory cells: Inhibition of graft versus host diseases and lymphoma. zur Publikation eingereicht. 2002.
- (42) Vincent MS, Roessner K, Lynch D, Wilson D, Cooper SM, Tschopp J, Sigal LH, Budd RC. Apoptosis of Fas^{high} CD4⁺ synovial T cells by borrelia-reactive Fas-ligand(high) gamma delta T cells in Lyme arthritis. *J Exp Med* 1996; 184(6):2109-2117.
- (43) Schilbach KE, Geiselhart A, Wessels JT, Niethammer D, Handgretinger R. Human gammadelta T lymphocytes exert natural and IL-2-induced cytotoxicity to neuroblastoma cells. *J Immunother* 2000; 23(5):536-548.

- (44) Landolfi MM, Van Houten N, Russell JQ, Scollay R, Parnes JR, Budd RC. CD2-CD4-CD8- lymph node T lymphocytes in MRL lpr/lpr mice are derived from a CD2+CD4+CD8+ thymic precursor. *J Immunol* 1993; 151(2):1086-1096.
- (45) Bix M, Coles M, Raulet D. Positive selection of V beta 8+ CD4-8- thymocytes by class I molecules expressed by hematopoietic cells. *J Exp Med* 1993; 178(3):901-908.
- (46) Herron LR, Eisenberg RA, Roper E, Kakkanaiah VN, Cohen PL, Kotzin BL. Selection of the T cell receptor repertoire in Lpr mice. *J Immunol* 1993; 151(7):3450-3459.
- (47) Takahama Y, Kosugi A, Singer A. Phenotype, ontogeny, and repertoire of CD4-CD8- T cell receptor alpha beta + thymocytes. Variable influence of self-antigens on T cell receptor V beta usage. *J Immunol* 1991; 146(4):1134-1141.
- (48) Erard F, Wild MT, Garcia-Sanz JA, Le Gros G. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science* 1993; 260(5115):1802-1805.
- (49) Hammond DM, Nagarkatti PS, Gote LR, Seth A, Hassuneh MR, Nagarkatti M. Double-negative T cells from MRL-lpr/lpr mice mediate cytolytic activity when triggered through adhesion molecules and constitutively express perforin gene. *J Exp Med* 1993; 178(6):2225-2230.
- (50) Cai Z, Sprent J. Resting and activated T cells display different requirements for CD8 molecules. *J Exp Med* 1994; 179(6):2005-2015.
- (51) Quaratino S, Murison G, Kryba RE, Verhoef A, Londei M. Human CD4- CD8- alpha beta+ T cells express a functional T cell receptor and can be activated by superantigens. *J Immunol* 1991; 147(10):3319-3323.
- (52) Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med* 1993; 178(1):1-16.
- (53) Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* 1994; 372(6507):691-694.
- (54) Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzaccaro RJ, Soriano T, Bloom BR, Brenner MB, Kronenberg M, Brennan PJ, . CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 1995; 269(5221):227-230.

- (55) Moody DB, Reinhold BB, Guy MR, Beckman EM, Frederique DE, Furlong ST, Ye S, Reinhold VN, Sieling PA, Modlin RL, Besra GS, Porcelli SA. Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells. *Science* 1997; 278(5336):283-286.
- (56) Spada FM, Koezuka Y, Porcelli SA. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med* 1998; 188(8):1529-1534.
- (57) Han M, Harrison L, Kehn P, Stevenson K, Currier J, Robinson MA. Invariant or highly conserved TCR alpha are expressed on double-negative (CD3+CD4-CD8-) and CD8+ T cells. *J Immunol* 1999; 163(1):301-311.
- (58) Matsumoto M, Yasukawa M, Inatsuki A, Kobayashi Y. Human double-negative (CD4-CD8-) T cells bearing alpha beta T cell receptor possess both helper and cytotoxic activities. *Clin Exp Immunol* 1991; 85(3):525-530.
- (59) Brooks EG, Wirt DP, Goldblum RM, Vaidya S, Asuncion MT, Patterson JC, Ware CF, Klimpel GR. Double-negative (CD4- CD8-) T cells with an alpha/beta T cell receptor. Non-MHC-restricted cytolytic activity and lymphokine production. *J Immunol* 1990; 144(12):4507-4512.
- (60) Yasukawa M, Hato T, Matsumoto M, Takada K, Fujita S, Kobayashi Y. Proliferation of double-negative (CD4-CD8-) T cells bearing T-cell receptor-alpha beta in a haemophiliac with human immunodeficiency virus type 1 infection and factor VIII inhibitor: functional properties of double-negative T-cell receptor-alpha beta+ T cells. *Br J Haematol* 1991; 79(3):372-376.
- (61) Strober S, Cheng L, Zeng D, Palathumapat R, Dejbakhsh-Jones S, Huie P, Sibley R. Double negative (CD4-CD8- alpha beta+) T cells which promote tolerance induction and regulate autoimmunity. *Immunol Rev* 1996; 149:217-230.
- (62) Strober S, Palathumapat V, Schwadron R, Hertel-Wulff B. Cloned natural suppressor cells prevent lethal graft-vs-host disease. *J Immunol* 1987; 138(3):699-703.
- (63) Zhang ZX, Young K, Zhang L. CD3+CD4-CD8- alphabeta-TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J Mol Med* 2001; 79(8):419-427.
- (64) Young KJ, DuTemple B, Zhang Z, Levy G, Zhang L. CD4(-)CD8(-) regulatory T cells implicated in preventing graft-versus- host and promoting graft-versus-leukemia responses. *Transplant Proc* 2001; 33(1-2):1762-1763.
- (65) Priatel JJ, Utting O, Teh HS. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J Immunol* 2001; 167(11):6188-6194.

- (66) Bleesing JJ, Brown MR, Dale JK, Straus SE, Lenardo MJ, Puck JM, Atkinson TP, Fleisher TA. TcR-alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T cells in humans with the autoimmune lymphoproliferative syndrome express a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and represents a marker of altered O-glycan biosynthesis. *Clin Immunol* 2001; 100(3):314-324.
- (67) Khan Q, Penninger JM, Yang L, Marra LE, Kozieradzki I, Zhang L. Regulation of apoptosis in mature alphabeta+CD4-CD8- antigen-specific suppressor T cell clones. *J Immunol* 1999; 162(10):5860-5867.
- (68) Hamad AR, Srikrishnan A, Mirmonsef P, Broeren CP, June CH, Pardoll D, Schneck JP. Lack of coreceptor allows survival of chronically stimulated double-negative alpha/beta T cells: implications for autoimmunity. *J Exp Med* 2001; 193(10):1113-1121.
- (69) Newell MK, Haughn LJ, Maroun CR, Julius MH. Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature* 1990; 347(6290):286-289.
- (70) Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, Kurre R, Haigwood N, Sekaly RP, Finkel TH. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med* 1992; 176(4):1099-1106.
- (71) Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Miko E, Polgar B, Palkovics T. The role of gamma/delta T cells in the feto-maternal relationship. *Semin Immunol* 2001; 13(4):229-233.
- (72) Flynn L, Byrne B, Carton J, Kelehan P, O'Herlihy C, O'Farrelly C. Menstrual cycle dependent fluctuations in NK and T-lymphocyte subsets from non-pregnant human endometrium. *Am J Reprod Immunol* 2000; 43(4):209-217.
- (73) Krejsek J, Kral B, Vokurkova D, Derner V, Touskova M, Parakova Z, Kopecky O. Decreased peripheral blood gamma delta T cells in patients with bronchial asthma. *Allergy* 1998; 53(1):73-77.
- (74) Robak E, Niewiadomska H, Robak T, Bartkowiak J, Blonski JZ, Wozniacka A, Pomorski L, Sysa-Jedrezejowska A. Lymphocytes Tgamma delta in clinically normal skin and peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus and their correlation with disease activity. *Mediators Inflamm* 2001; 10(4):179-189.
- (75) Niehues T, Gulwani-Akolkar B, Goldman IS, McKinley MJ, Silver J. Marked gamma delta T-cell decrease in peripheral blood of patients with primary biliary cirrhosis (PBC). *Autoimmunity* 1994; 18(4):267-273.
- (76) Skeen MJ, Ziegler HK. Induction of murine peritoneal gamma/delta T cells and their role in resistance to bacterial infection. *J Exp Med* 1993; 178(3):971-984.

- (77) van der Heyde HC, Manning DD, Weidanz WP. Role of CD4+ T cells in the expansion of the CD4-, CD8- gamma delta T cell subset in the spleens of mice during blood-stage malaria. *J Immunol* 1993; 151(11):6311-6317.
- (78) Wesch D, Marx S, Kabelitz D. Comparative analysis of alpha beta and gamma delta T cell activation by *Mycobacterium tuberculosis* and isopentenyl pyrophosphate. *Eur J Immunol* 1997; 27(4):952-956.
- (79) Carding SR, Allan W, Kyes S, Hayday A, Bottomly K, Doherty PC. Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by gamma/delta + T cells. *J Exp Med* 1990; 172(4):1225-1231.
- (80) Mukasa A, Yoshida H, Kobayashi N, Matsuzaki G, Nomoto K. Gamma delta T cells in infection-induced and autoimmune-induced testicular inflammation. *Immunology* 1998; 95(3):395-401.
- (81) Kaufmann SH, Blum C, Yamamoto S. Crosstalk between alpha/beta T cells and gamma/delta T cells in vivo: activation of alpha/beta T-cell responses after gamma/delta T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(20):9620-9624.
- (82) Kaufmann SH. gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(6):2272-2279.
- (83) Hayday AC. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:975-1026.
- (84) Born W, Cady C, Jones-Carson J, Mukasa A, Lahn M, O'Brien R. Immunoregulatory functions of gamma delta T cells. *Adv Immunol* 1999; 71:77-144.
- (85) Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994; 76(2):287-299.
- (86) Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL, Fan DP, Braciale TJ. Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med* 1986; 163(4):903-921.
- (87) Smith PA, Brunmark A, Jackson MR, Potter TA. Peptide-independent recognition by alloreactive cytotoxic T lymphocytes (CTL). *J Exp Med* 1997; 185(6):1023-1033.
- (88) Nossal GJ. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 1994; 76(2):229-239.

- (89) Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987; 49(2):273-280.
- (90) Kurts C, Sutherland RM, Davey G, Li M, Lew AM, Blanas E, Carbone FR, Miller JF, Heath WR. CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(22):12703-12707.
- (91) Geissler EK, Scherer MN, Graeb C. Soluble donor MHC class I antigen inhibits immunologic priming in vitro and in vivo. *Transpl Int* 1998; 11 Suppl 1:S357-S360.
- (92) Geissler EK, Korzun WJ, Graeb C. Secreted donor-MHC class I antigen prolongs liver allograft survival and inhibits recipient anti-donor cytotoxic T lymphocyte responses. *Transplantation* 1997; 64(5):782-786.
- (93) Scherer MN, Graeb C, Tange S, Justl M, Jauch K, Geissler EK. Soluble allogeneic MHC class I molecule gene transfer promotes CTL apoptosis in vivo. *Transplant Proc* 2001; 33(1-2):583-584.
- (94) Graeb C, Justl M, Tange S, Jauch KW, Geissler EK. An adenoviral gene transfer system to express high levels of soluble allogeneic MHC class I molecules in vitro and in vivo. *Transplant Proc* 2002; 34(6):2318-2319.
- (95) Graeb C, Justl M, Scherer MN, Tange S, Frank E, Jauch KW, Geissler EK. Expression of high levels of soluble allogeneic major histocompatibility complex class I antigen by adenoviral gene transfer strongly inhibits allospecific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Transplant Proc* 2002; 34(5):1398-1399.
- (96) Tange S, Graeb C, Scherer MN, Frank E, Jauch K, Geissler EK. Soluble donor MHC class I gene therapy prevents accelerated heart allograft rejection in actively sensitized rat recipients. *Transplant Proc* 2001; 33(1-2):579-580.
- (97) Miller RG, Derry H. A cell population in nu/nu spleen can prevent generation of cytotoxic lymphocytes by normal spleen cells against self antigens of the nu/nu spleen. *J Immunol* 1979; 122(4):1502-1509.
- (98) Muraoka S, Miller RG. Cells in bone marrow and in T cell colonies grown from bone marrow can suppress generation of cytotoxic T lymphocytes directed against their self antigens. *J Exp Med* 1980; 152(1):54-71.
- (99) Rachamim N, Gan J, Segall H, Krauthgamer R, Marcus H, Berrebi A, Martelli M, Reisner Y. Tolerance induction by "megadose" hematopoietic transplants: donor-type human CD34 stem cells induce potent specific reduction of host anti-donor cytotoxic T lymphocyte precursors in mixed lymphocyte culture. *Transplantation* 1998; 65(10):1386-1393.

- (100) Miller RG, Derry H. A cell population in nu/nu spleen can prevent generation of cytotoxic lymphocytes by normal spleen cells against self antigens of the nu/nu spleen. *J Immunol* 1979; 122(4):1502-1509.
- (101) Muraoka S, Miller RG. Cells in murine fetal liver and in lymphoid colonies grown from fetal liver can suppress generation of cytotoxic T lymphocytes directed against their self antigens. *J Immunol* 1983; 131(1):45-49.
- (102) Martin DR, Miller RG. In vivo administration of histoincompatible lymphocytes leads to rapid functional deletion of cytotoxic T lymphocyte precursors. *J Exp Med* 1989; 170(3):679-690.
- (103) Nagai M, Azuma E, Qi J, Kumamoto T, Hiratake S, Hirayama M, Umemoto M, Komada Y, Sakurai M. Suppression of alloreactivity with gamma delta T-cells: relevance to increased gamma delta T-cells following bone marrow transplantation. *Biomed Pharmacother* 1998; 52(3):137-142.
- (104) Tscherning T, Claesson MH. Veto suppression: the peripheral way of T cell tolerization. *Exp Clin Immunogenet* 1993; 10(4):179-188.
- (105) Van Kaer L. Accessory proteins that control the assembly of MHC molecules with peptides. *Immunol Res* 2001; 23(2-3):205-214.
- (106) Gromme M, Neefjes J. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 2002; 39(3-4):181-202.
- (107) Rock KL, Rothstein L, Benacerraf B. Analysis of the association of peptides of optimal length to class I molecules on the surface of cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(19):8918-8922.
- (108) Day PM, Yewdell JW, Porgador A, Germain RN, Bennink JR. Direct delivery of exogenous MHC class I molecule-binding oligopeptides to the endoplasmic reticulum of viable cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(15):8064-8069.
- (109) Luft T, Rizkalla M, Tai TY, Chen Q, MacFarlan RI, Davis ID, Maraskovsky E, Cebon J. Exogenous peptides presented by transporter associated with antigen processing (TAP)-deficient and TAP-competent cells: intracellular loading and kinetics of presentation. *J Immunol* 2001; 167(5):2529-2537.
- (110) Garcia KC, Scott CA, Brunmark A, Carbone FR, Peterson PA, Wilson IA, Teyton L. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* 1996; 384(6609):577-581.

- (111) Busch DH, Pamer EG. T cell affinity maturation by selective expansion during infection. *J Exp Med* 1999; 189(4):701-710.
- (112) Bunnell SC, Hong DI, Kardon JR, Yamazaki T, McGlade CJ, Barr VA, Samelson LE. T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J Cell Biol* 2002; 158(7):1263-1275.
- (113) Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999; 285(5425):221-227.
- (114) Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 1998; 8(6):723-732.
- (115) Janes PW, Ley SC, Magee AI. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol* 1999; 147(2):447-461.
- (116) Fuller CL, Braciale VL, Samelson LE. All roads lead to actin: the intimate relationship between TCR signaling and the cytoskeleton. *Immunol Rev* 2003; 191:220-236.
- (117) Tsang JY, Chai JG, Lechler R. Antigen presentation by mouse CD4+ T cells involving acquired MHC class II:peptide complexes: another mechanism to limit clonal expansion? *Blood* 2003; 101(7):2704-2710.
- (118) Howland KC, Ausubel LJ, London CA, Abbas AK. The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. *J Immunol* 2000; 164(9):4465-4470.
- (119) Liu H, Rhodes M, Wiest DL, Vignali DA. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 2000; 13(5):665-675.
- (120) Valitutti S, Muller S, Salio M, Lanzavecchia A. Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med* 1997; 185(10):1859-1864.
- (121) Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000; 192(1):63-75.
- (122) Salio M, Valitutti S, Lanzavecchia A. Agonist-induced T cell receptor down-regulation: molecular requirements and dissociation from T cell activation. *Eur J Immunol* 1997; 27(7):1769-1773.
- (123) Janeway C.A., Travers P. *Immunology*. 5 ed. Spektrum Verlag, 2002.

- (124) Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 1995; 375(6527):148-151.
- (125) Appay V, Rowland-Jones SL. The assessment of antigen-specific CD8+ T cells through the combination of MHC class I tetramer and intracellular staining. *J Immunol Methods* 2002; 268(1):9-19.
- (126) Boniface JJ, Rabinowitz JD, Wulfig C, Hampl J, Reich Z, Altman JD, Kantor RM, Beeson C, McConnell HM, Davis MM. Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands [corrected]. *Immunity* 1998; 9(4):459-466.
- (127) Xu XN, Purbhoo MA, Chen N, Mongkolsapaya J, Cox JH, Meier UC, Tafuro S, Dunbar PR, Sewell AK, Hourigan CS, Appay V, Cerundolo V, Burrows SR, McMichael AJ, Screaton GR. A novel approach to antigen-specific deletion of CTL with minimal cellular activation using alpha3 domain mutants of MHC class I/peptide complex. *Immunity* 2001; 14(5):591-602.
- (128) Xu XN, Screaton GR. MHC/peptide tetramer-based studies of T cell function. *J Immunol Methods* 2002; 268(1):21-28.
- (129) Takahashi M, Osono E, Nakagawa Y, Wang J, Berzofsky JA, Margulies DH, Takahashi H. Rapid induction of apoptosis in CD8+ HIV-1 envelope-specific murine CTLs by short exposure to antigenic peptide. *J Immunol* 2002; 169(11):6588-6593.
- (130) Singer GG, Abbas AK. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1994; 1(5):365-371.
- (131) Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng SJ, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. *Nat Immunol* 2003; 4(3):255-260.
- (132) Green DR. The suicide in the thymus, a twisted trail. *Nat Immunol* 2003; 4(3):207-208.
- (133) Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang LC, Coultas L, Puthalakath H, Pellegrini M, Cory S, Adams JM, Strasser A. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 2002; 415(6874):922-926.
- (134) Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* 2003; 88(2):212-218.
- (135) Sakata K, Sakata A, Kong L, Dang H, Talal N. Role of Fas/FasL interaction in physiology and pathology: the good and the bad. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 87(1):1-7.

- (136) Krueger A, Fas SC, Baumann S, Krammer PH. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* 2003; 193(1):58-69.
- (137) Maher S, Toomey D, Condrón C, Bouchier-Hayes D. Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunol Cell Biol* 2002; 80(2):131-137.
- (138) Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Sarin A, Berzofsky JA. Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. *J Exp Med* 1996; 184(2):485-492.
- (139) Martínez-Lorenzo MJ, Alava MA, Gamen S, Kim KJ, Chuntharapai A, Pineiro A, Naval J, Anel A. Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *Eur J Immunol* 1998; 28(9):2714-2725.
- (140) Spaner D, Raju K, Radvanyi L, Lin Y, Miller RG. A role for perforin in activation-induced cell death. *J Immunol* 1998; 160(6):2655-2664.
- (141) Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994; 76(6):969-976.
- (142) Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995; 270(5239):1189-1192.
- (143) Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995; 377(6550):630-632.
- (144) Saas P, Walker PR, Hahne M, Quiquerez AL, Schnuriger V, Perrin G, French L, Van Meir EG, de Tribolet N, Tschopp J, Dietrich PY. Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain? *J Clin Invest* 1997; 99(6):1173-1178.
- (145) O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today* 1999; 20(1):46-52.
- (146) Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, Brady C, Roche D, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol* 1998; 160(11):5669-5675.
- (147) O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 1996; 184(3):1075-1082.

- (148) Restifo NP. Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nat Med* 2000; 6(5):493-495.
- (149) Kang SM, Schneider DB, Lin Z, Hanahan D, Dichek DA, Stock PG, Baekkeskov S. Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat Med* 1997; 3(7):738-743.
- (150) Ehl S, Hoffmann-Rohrer U, Nagata S, Hengartner H, Zinkernagel R. Different susceptibility of cytotoxic T cells to CD95 (Fas/Apo-1) ligand-mediated cell death after activation in vitro versus in vivo. *J Immunol* 1996; 156(7):2357-2360.
- (151) Zipp F, Martin R, Lichtenfels R, Roth W, Dichgans J, Krammer PH, Weller M. Human autoreactive and foreign antigen-specific T cells resist apoptosis induced by soluble recombinant CD95 ligand. *J Immunol* 1997; 159(5):2108-2115.
- (152) Rescigno M, Piguet V, Valzasina B, Lens S, Zubler R, French L, Kindler V, Tschopp J, Ricciardi-Castagnoli P. Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1 β , and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med* 2000; 192(11):1661-1668.
- (153) Restifo NP. Building better vaccines: how apoptotic cell death can induce inflammation and activate innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(5):597-603.
- (154) Allison J, Georgiou HM, Strasser A, Vaux DL. Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(8):3943-3947.
- (155) Wahlsten JL, Gitchell HL, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. Fas and Fas ligand expressed on cells of the immune system, not on the target tissue, control induction of experimental autoimmune uveitis. *J Immunol* 2000; 165(10):5480-5486.
- (156) Li JH, Rosen D, Sondel P, Berke G. Immune privilege and FasL: two ways to inactivate effector cytotoxic T lymphocytes by FasL-expressing cells. *Immunology* 2002; 105(3):267-277.
- (157) Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 1995; 14(6):1129-1135.
- (158) Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263(5154):1759-1762.

- (159) Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, Zheng L. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:221-253.
- (160) Reich A, Korner H, Sedgwick JD, Pircher H. Immune down-regulation and peripheral deletion of CD8 T cells does not require TNF receptor-ligand interactions nor CD95 (Fas, APO-1). *Eur J Immunol* 2000; 30(2):678-682.
- (161) Davidson WF, Haudenschild C, Kwon J, Williams MS. T cell receptor ligation triggers novel nonapoptotic cell death pathways that are Fas-independent or Fas-dependent. *J Immunol* 2002; 169(11):6218-6230.
- (162) Hildeman DA, Mitchell T, Teague TK, Henson P, Day BJ, Kappler J, Marrack PC. Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity* 1999; 10(6):735-744.
- (163) Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 1999; 5(11):1298-1302.
- (164) Li XC, Li Y, Dodge I, Wells AD, Zheng XX, Turka LA, Strom TB. Induction of allograft tolerance in the absence of Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 1999; 163(5):2500-2507.
- (165) Wei CH, Beeson C, Masucci MG, Levitsky V. A partially agonistic peptide acts as a selective inducer of apoptosis in CD8+ CTLs. *J Immunol* 1999; 163(5):2601-2609.
- (166) Wei CH, Yagita H, Masucci MG, Levitsky V. Different programs of activation-induced cell death are triggered in mature activated CTL by immunogenic and partially agonistic peptide ligands. *J Immunol* 2001; 166(2):989-995.
- (167) Zavazava N, Kronke M. Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nat Med* 1996; 2(9):1005-1010.
- (168) Kambayashi T, Ichihara F, Jensen PE, Ljunggren HG. Soluble MHC class I molecules induce cellular death in a CD8+ T-cell hybridoma tumor model. *Int J Cancer* 2001; 91(3):373-378.
- (169) Contini P, Ghio M, Poggi A, Filaci G, Indiveri F, Ferrone S, Puppo F. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* 2003; 33(1):125-134.
- (170) Radvanyi LG, Mills GB, Miller RG. Religation of the T cell receptor after primary activation of mature T cells inhibits proliferation and induces apoptotic cell death. *J Immunol* 1993; 150(12):5704-5715.

- (171) Janssen O, Wesselborg S, Kabelitz D. Immunosuppression by OKT3--induction of programmed cell death (apoptosis) as a possible mechanism of action. *Transplantation* 1992; 53(1):233-234.
- (172) Wesselborg S, Janssen O, Kabelitz D. Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J Immunol* 1993; 150(10):4338-4345.
- (173) Mackensen A, Wittnebel S, Veelken H, Noppen C, Spagnoli GC, Lindermann A. Induction and large-scale expansion of CD8+ tumor specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood lymphocytes by in vitro stimulation with CD80-transfected autologous melanoma cells. *Eur Cytokine Netw* 1999; 10(3):329-336.
- (174) Bellone M, Iezzi G, Manfredi AA, Protti MP, Dellabona P, Casorati G, Rugarli C. In vitro priming of cytotoxic T lymphocytes against poorly immunogenic epitopes by engineered antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 1994; 24(11):2691-2698.
- (175) Zhou J, Zhang JS, Ma BL, Mamula MJ. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the Wistar rat: dependence of MBP-specific T cell responsiveness on B7 costimulation. *Autoimmunity* 2002; 35(3):191-199.
- (176) Fillion LG, Matusevicius D, Graziani-Bowering GM, Kumar A, Freedman MS. Monocyte-derived IL12, CD86 (B7-2) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2003; 106(2):127-138.
- (177) Kinoshita K, Tesch G, Schwarting A, Maron R, Sharpe AH, Kelley VR. Costimulation by B7-1 and B7-2 is required for autoimmune disease in MRL-Faslpr mice. *J Immunol* 2000; 164(11):6046-6056.
- (178) Shao H, Woon MD, Nakamura S, Sohn JH, Morton PA, Bora NS, Kaplan HJ. Requirement of B7-mediated costimulation in the induction of experimental autoimmune anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(9):2016-2021.
- (179) Herold KG, Lenschow DJ, Bluestone JA. CD28/B7 regulation of autoimmune diabetes. *Immunol Res* 1997; 16(1):71-84.
- (180) Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; 3(5):541-547.
- (181) Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Walunas TL, Miller SD, Bluestone JA. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* 1996; 184(2):783-788.

- (182) Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* 1998; 18(5):389-418.
- (183) Ramarathinam L, Castle M, Wu Y, Liu Y. T cell costimulation by B7/BB1 induces CD8 T cell-dependent tumor rejection: an important role of B7/BB1 in the induction, recruitment, and effector function of antitumor T cells. *J Exp Med* 1994; 179(4):1205-1214.
- (184) Chang TT, Jabs C, Sobel RA, Kuchroo VK, Sharpe AH. Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 1999; 190(5):733-740.
- (185) Matsumoto K, Anasetti C. The role of T cell costimulation by CD80 in the initiation and maintenance of the immune response to human leukemia. *Leuk Lymphoma* 1999; 35(5-6):427-435.
- (186) Daniel PT, Kroidl A, Cayeux S, Bargou R, Blankenstein T, Dorken B. Costimulatory signals through B7.1/CD28 prevent T cell apoptosis during target cell lysis. *J Immunol* 1997; 159(8):3808-3815.
- (187) Li W, Lu L, Wang Z, Wang L, Fung JJ, Thomson AW, Qian S. Costimulation blockade promotes the apoptotic death of graft-infiltrating T cells and prolongs survival of hepatic allografts from FLT3L-treated donors. *Transplantation* 2001; 72(8):1423-1432.
- (188) Noel PJ, Boise LH, Green JM, Thompson CB. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol* 1996; 157(2):636-642.
- (189) Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:991-1045.
- (190) Salter RD, Howell DN, Cresswell P. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 1985; 21(3):235-246.
- (191) Ferlazzo G, Semino C, Melioli G. HLA class I molecule expression is up-regulated during maturation of dendritic cells, protecting them from natural killer cell-mediated lysis. *Immunol Lett* 2001; 76(1):37-41.
- (192) Meidenbauer N, Marienhagen J, Laumer M, Vogl S, Heymann J, Andreessen R, Mackensen A. Survival and tumor localization of adoptively transferred Melan-A-specific T cells in melanoma patients. *J Immunol* 2003; 170(4):2161-2169.
- (193) Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 1998; 8(1):89-95.

- (194) Fischer K, Andreesen R, Mackensen A. An improved flow cytometric assay for the determination of cytotoxic T lymphocyte activity. *J Immunol Methods* 2002; 259(1-2):159-169.
- (195) Sjöström A, Eriksson M, Cerboni C, Johansson MH, Sentman CL, Karre K, Hoglund P. Acquisition of external major histocompatibility complex class I molecules by natural killer cells expressing inhibitory Ly49 receptors. *J Exp Med* 2001; 194(10):1519-1530.
- (196) Scharz NE, Chaput N, Andre F, Zitvogel L. From the antigen-presenting cell to the antigen-presenting vesicle: the exosomes. *Curr Opin Mol Ther* 2002; 4(4):372-381.
- (197) Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001; 7(3):297-303.
- (198) Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, Plachy J, Stangassinger M, Erfle V, Schlondorff D. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med* 2000; 6(7):769-775.
- (199) Thery C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* 1999; 147(3):599-610.
- (200) Singh PB, Brown RE, Roser B. MHC antigens in urine as olfactory recognition cues. *Nature* 1987; 327(6118):161-164.
- (201) Demaria S, Bushkin Y. Soluble HLA proteins with bound peptides are released from the cell surface by the membrane metalloproteinase. *Hum Immunol* 2000; 61(12):1332-1338.
- (202) Zavazava N, Wobst B, Ferstl R, Müller-Ruchholtz W. Soluble MHC class I molecules in human body fluids. *J Clin Lab Anal* 1994; 8(6):432-436.
- (203) McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 2003; 300(5623):1295-1297.
- (204) Yao V, Platell C, Hall JC. Dendritic cells. *ANZ J Surg* 2002; 72(7):501-506.
- (205) Boudaly S, Morin J, Berthier R, Marche P, Boitard C. Altered dendritic cells (DC) might be responsible for regulatory T cell imbalance and autoimmunity in nonobese diabetic (NOD) mice. *Eur Cytokine Netw* 2002; 13(1):29-37.

- (206) Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002; 80(5):477-483.
- (207) Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 192(9):1213-1222.
- (208) Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; 299(5609):1033-1036.
- (209) Stagg AJ, Kamm MA, Knight SC. Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin. *Eur J Immunol* 2002; 32(5):1445-1454.
- (210) Ismaili J, Olislagers V, Poupot R, Fournie JJ, Goldman M. Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation. *Clin Immunol* 2002; 103(3 Pt 1):296-302.
- (211) Kimachi K, Sugie K, Grey HM. Effector T cells have a lower ligand affinity threshold for activation than naive T cells. *Int Immunol* 2003; 15(7):885-892.
- (212) Radvanyi LG, Shi Y, Mills GB, Miller RG. Cell cycle progression out of G1 sensitizes primary-cultured nontransformed T cells to TCR-mediated apoptosis. *Cell Immunol* 1996; 170(2):260-273.
- (213) McFarland HL, Hansal SA, Morris DI, McVicar DW, Love PE, Rosenberg AS. Signaling through MHC in transgenic mice generates a population of memory phenotype cytolytic cells that lack TCR. *Blood* 2003; 101(11):4520-4528.
- (214) Oelke M, Moehrle U, Chen JL, Behringer D, Cerundolo V, Lindemann A, Mackensen A. Generation and purification of CD8+ melan-A-specific cytotoxic T lymphocytes for adoptive transfer in tumor immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5):1997-2005.
- (215) Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; 182(5):1545-1556.
- (216) Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148(7):2207-2216.
- (217) Devireddy LR, Green MR. Transcriptional program of apoptosis induction following interleukin 2 deprivation: identification of RC3, a calcium/calmodulin binding protein, as a novel proapoptotic factor. *Mol Cell Biol* 2003; 23(13):4532-4541.

- (218) Radvanyi LG, Raju K, Spaner D, Mills GB, Miller RG. Interleukin-2 reverses the defect in activation-induced apoptosis in T cells from autoimmune lpr mice. *Cell Immunol* 1998; 183(1):1-12.
- (219) Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 1995; 377(6548):446-448.
- (220) Zhang D, Beresford PJ, Greenberg AH, Lieberman J. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(10):5746-5751.
- (221) Chrobak P, Gress RE. Veto activity of activated bone marrow does not require perforin and Fas ligand. *Cell Immunol* 2001; 208(2):80-87.
- (222) Liu MF, Yang CY, Chao SC, Li JS, Weng TH, Lei HY. Distribution of double-negative (CD4-CD8-, DN) T subsets in blood and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1999; 18(3):227-231.
- (223) Robinson AT, Miller N, Alexander DR. CD3 antigen-mediated calcium signals and protein kinase C activation are higher in CD45R0+ than in CD45RA+ human T lymphocyte subsets. *Eur J Immunol* 1993; 23(1):61-68.
- (224) Glatzel A, Wesch D, Schiemann F, Brandt E, Janssen O, Kabelitz D. Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood gamma delta T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V delta 2/V gamma 9 gamma delta T cells. *J Immunol* 2002; 168(10):4920-4929.
- (225) Gerli R, Agea E, Muscat C, Bertotto A, Ercolani R, Bistoni O, Bini P, Spinozzi F, Venanzi F. Functional characterization of T cells bearing the gamma/delta T-cell receptor in patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1993; 11(3):295-299.
- (226) Selmaj K, Brosnan CF, Raine CS. Colocalization of lymphocytes bearing gamma delta T-cell receptor and heat shock protein hsp65+ oligodendrocytes in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(15):6452-6456.
- (227) Kaufmann SH. gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(6):2272-2279.
- (228) Roszkowski JJ, Yu DC, Rubinstein MP, McKee MD, Cole DJ, Nishimura MI. CD8-independent tumor cell recognition is a property of the T cell receptor and not the T cell. *J Immunol* 2003; 170(5):2582-2589.

- (229) Jaramillo A, Majumder K, Manna PP, Fleming TP, Doherty G, Dipersio JF, Mohanakumar T. Identification of HLA-A3-restricted CD8+ T cell epitopes derived from mammaglobin-A, a tumor-associated antigen of human breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 102(5):499-506.
- (230) Trojan A, Tun-Kyi A, Odermatt B, Nestle FO, Stahel RA. Functional detection of epithelial cell adhesion molecule specific cytotoxic T lymphocytes in patients with lung cancer, colorectal cancer and in healthy donors. *Lung Cancer* 2002; 36(2):151-158.
- (231) Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997; 278(5336):294-298.
- (232) Sobek V, Balkow S, Korner H, Simon MM. Antigen-induced cell death of T effector cells in vitro proceeds via the Fas pathway, requires endogenous interferon-gamma and is independent of perforin and granzymes. *Eur J Immunol* 2002; 32(9):2490-2499.
- (233) Puppo F, Contini P, Ghio M, Brenci S, Scudeletti M, Filaci G, Ferrone S, Indiveri F. Soluble human MHC class I molecules induce soluble Fas ligand secretion and trigger apoptosis in activated CD8(+) Fas (CD95)(+) T lymphocytes. *Int Immunol* 2000; 12(2):195-203.
- (234) Daniel PT, Kroidl A, Kopp J, Sturm I, Moldenhauer G, Dorken B, Pezzutto A. Immunotherapy of B-cell lymphoma with CD3x19 bispecific antibodies: costimulation via CD28 prevents "veto" apoptosis of antibody-targeted cytotoxic T cells. *Blood* 1998; 92(12):4750-4757.
- (235) Contini P, Ghio M, Poggi A, Filaci G, Indiveri F, Ferrone S, Puppo F. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* 2003; 33(1):125-134.
- (236) Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 1996; 156(1):5-7.
- (237) Chu CQ, Wittmer S, Dalton DK. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2000; 192(1):123-128.
- (238) Dalton DK, Haynes L, Chu CQ, Swain SL, Wittmer S. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J Exp Med* 2000; 192(1):117-122.
- (239) Refaelli Y, Van Parijs L, Alexander SI, Abbas AK. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med* 2002; 196(7):999-1005.

- (240) Gorak-Stolinska P, Kemeny DM, Noble A. Activation-induced cell death in human T cells is a suicidal process regulated by cell density but superantigen induces T cell fratricide. *Cell Immunol* 2002; 219(2):98-107.
- (241) Rao AS, Demetris AJ, Qian S, Murase N, Li Y, Fung JJ, Starzl TE. Interferon-gamma induced expression of MHC antigens facilitates identification of donor cells in chimeric transplant recipients. *Cell Transplant* 1994; 3(4):345-348.
- (242) Gastl G, Ebert T, Finstad CL, Sheinfeld J, Gomahr A, Aulitzky W, Bander NH. Major histocompatibility complex class I and class II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma. *J Urol* 1996; 155(1):361-367.
- (243) Critchfield JM, Racke MK, Zuniga-Pflucker JC, Cannella B, Raine CS, Goverman J, Lenardo MJ. T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 263(5150):1139-1143.
- (244) Valmori D, Fonteneau JF, Lizana CM, Gervois N, Lienard D, Rimoldi D, Jongeneel V, Jotereau F, Cerottini JC, Romero P. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 1998; 160(4):1750-1758.
- (245) Menon AG, Morreau H, Tollenaar RA, Alphenaar E, Van Puijenbroek M, Putter H, Janssen-Van Rhijn CM, Van De Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ. Down-regulation of HLA-A expression correlates with a better prognosis in colorectal cancer patients. *Lab Invest* 2002; 82(12):1725-1733.
- (246) van Duinen SG, Ruiter DJ, Broecker EB, van der Velde EA, Sorg C, Welvaart K, Ferrone S. Level of HLA antigens in locoregional metastases and clinical course of the disease in patients with melanoma. *Cancer Res* 1988; 48(4):1019-1025.
- (247) Concha A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Can the HLA phenotype be used as a prognostic factor in breast carcinomas? *Int J Cancer Suppl* 1991; 6:146-154.
- (248) O'Herrin SM, Slansky JE, Tang Q, Markiewicz MA, Gajewski TF, Pardoll DM, Schneck JP, Bluestone JA. Antigen-specific blockade of T cells in vivo using dimeric MHC peptide. *J Immunol* 2001; 167(5):2555-2560.
- (249) Maile R, Wang B, Schooler W, Meyer A, Collins EJ, Frelinger JA. Antigen-specific modulation of an immune response by in vivo administration of soluble MHC class I tetramers. *J Immunol* 2001; 167(7):3708-3714.

- (250) Contini P, Ghio M, Merlo A, Brenzi S, Filaci G, Indiveri F, Puppo F. Soluble HLA class I/CD8 ligation triggers apoptosis in EBV-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes by Fas/Fas-ligand interaction. *Hum Immunol* 2000; 61(12):1347-1351.
- (251) Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 1999; 5(11):1298-1302.
- (252) Wells AD, Li XC, Li Y, Walsh MC, Zheng XX, Wu Z, Nunez G, Tang A, Sayegh M, Hancock WW, Strom TB, Turka LA. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med* 1999; 5(11):1303-1307.
- (253) Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:233-258.
- (254) Mackensen A, Wittnebel S, Veelken H, Noppen C, Spagnoli GC, Lindermann A. Induction and large-scale expansion of CD8⁺ tumor specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood lymphocytes by in vitro stimulation with CD80-transfected autologous melanoma cells. *Eur Cytokine Netw* 1999; 10(3):329-336.
- (255) Guckel B, Lindauer M, Rudy W, Habicht A, Siebels M, Kaul S, Bastert G, Meuer SC, Moebius U. CD80-transfected human breast and ovarian tumor cell lines: improved immunogenicity and induction of cytolytic CD8⁺ T lymphocytes. *Cytokines Mol Ther* 1995; 1(3):211-221.
- (256) Oelke M, Maus MV, Didiano D, June CH, Mackensen A, Schneck JP. Ex vivo induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells. *Nat Med* 2003; 9(5):619-625.
- (257) Radvanyi LG, Shi Y, Vaziri H, Sharma A, Dhala R, Mills GB, Miller RG. CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol* 1996; 156(5):1788-1798.
- (258) Shi Y, Radvanyi LG, Sharma A, Shaw P, Green DR, Miller RG, Mills GB. CD28-mediated signaling in vivo prevents activation-induced apoptosis in the thymus and alters peripheral lymphocyte homeostasis. *J Immunol* 1995; 155(4):1829-1837.
- (259) Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1995; 3(1):87-98.

- (260) Burr JS, Savage ND, Messah GE, Kimzey SL, Shaw AS, Arch RH, Green JM. Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL. *J Immunol* 2001; 166(9):5331-5335.
- (261) Rachmilewitz J, Lanzavecchia A. A temporal and spatial summation model for T-cell activation: signal integration and antigen decoding. *Trends Immunol* 2002; 23(12):592-595.